



Aalto-yliopisto
Kemian tekniikan
korkeakoulu

Kemian tekniikan korkeakoulu
Kemian tekniikan koulutusohjelma

Petra Pasonen

**ALTISTUKSEN ARVIOINTI MIKROBIOLOGISESSA RISKINARVIONNISSA -
TAPAUSTUTKIMUS *LISTERIA MONOCYTOGENES* -BAKTEERISTA
SELLAISENAAN SYÖTÄVISSÄ KALA-, LIHA- JA MAITOTUOTTEISSA**

**Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi diplomi-
insinöörin tutkintoa varten Espoossa 03.03.2015.**

Valvoja

Professori Simo Laakso

Ohjaaja

Eläinlääketieteen tohtori Pirkko Tuominen

Tekijä Petra Pasonen

Työn nimi Altistuksen arviointi mikrobiologisessa riskinarvioinnissa - tapaustutkimus *Listeria monocytogenes* -bakteerista sellaisenaan syötävissä kala-, liha- ja maitotuotteissa

Laitos Biotekniikan ja Kemian tekniikan laitos

Professuuri Soveltava biokemia

Professuurikoodi Kem-30

Työn valvoja Professori Simo Laakso

Työn ohjaaja Eläinlääketieteen tohtori Pirkko Tuominen

Päivämäärä 03.03.2015

Sivumäärä 83

Kieli suomi

Tiivistelmä

Tämä diplomityö käsittelee mikrobiologista riskinarviointia. Tarkemmin syvennyttään *Listeria monocytogenes* -bakteerin altistuksen arviointiin. *L. monocytogenes* on laajalti maaperässä ja villieläimissä esiintyvä patogeeni, joka pystyy kontaminoimaan erilaisia elintarvikkeita. *L. monocytogenes* -bakteerin eliminoiminen elintarvikkeista on hankalaa, sillä se sietää hyvin erilaisia säilöntämenetelmiä ja pystyy kasvamaan jääkaappilämpötiloissa. Listerioosi on vaarallinen etenkin henkilöille, joiden immunitetti on alentunut.

Kokeellisessa osiossa tarkastellaan erilaisia sellaisenaan syötäviä (*ready-to-eat*, RTE) elintarvikkeita *L. monocytogenes* -bakteerin esiintymisen kannalta. Aineistona oli kansallisia listeriakartoituksia vuosilta 2004, 2008, 2011 ja 2012, sekä EU:n listeriakartoitus vuodelta 2010. Tutkittavia elintarvikeluokkia oli kolme: graavisuolattut ja kylmäsavustetut kalatuotteet, pakatut RTE-lihatuotteet sekä maitotuotteista raakamaito ja homejuustot. Tutkimus suoritettiin tilastollisilla menetelmillä sekä simuloimalla elintarvikkeiden *L. monocytogenes* -pitoisuustietoja tutkimuspäivästä viimeiseen käyttöpäivään.

L. monocytogenes -prevalenssi oli suurinta graavisuolatuissa ja kylmäsavustetuissa kalatuotteissa. Esiintymistä nosti vielä, jos tuote oli pakattu vakuumi- tai suojakaasupakkaukseen tai jos tuote oli viipaloitu. Raakamaidossa esiintyminen oli vähäisempää ja lihatuotteissa hyvin pientä. Homejuustossa positiivisia näytteitä ei ollut lainkaan. Lain mukaisen pitoisuuden ylärajan, 100 pmy/g, ylityksiä tapahtui ainoastaan kalatuotteissa. Ylitysten määrä oli niissäkin vähäinen. Pitoisuutta voi kuitenkin nostaa liian korkea säilytyslämpötila. Simulointien perusteella pienikin alkupitoisuus voi nousta kalatuotteiden säilytysajan aikana merkittäväksi.

Näiden tulosten perusteella altistus arvioitiin kvalitatiivisesti isoimmaksi graavisuolatuissa ja kylmäsavustetuissa kalatuotteissa. Altistusta kuitenkin vähentää pieni kulutus. Vastaavasti raakamaidon isompi kulutus nosti altistusta, vaikka prevalenssi ja konsentraatiot ovatkin pienempiä. Lihatuotteiden kohdalla altistus arvioitiin hyvin pieneksi.

Avainsanat *Listeria monocytogenes*, riskinarviointi, altistuksen arviointi

Author Petra Pasonen

Title of thesis Exposure Assessment in Microbiological Risk Assessment - A Case Study of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Fish, Meat and Dairy Products

Department Department of Biotechnology and Chemical Technology

Professorship Applied biochemistry**Code of professorship** Kem-30

Thesis supervisor Professor Simo Laakso

Thesis advisor Doctor of Veterinary Medicine Pirkko Tuominen

Date 03.03.2015**Number of pages** 83**Language** Finnish

Abstract

This master's thesis concerns microbiological risk assessment. More precise information is given on the exposure assessment of *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* is widely found in soil and wild animals. It has a capability to contaminate many different kinds of foods. Elimination of *L. monocytogenes* from food is challenging, since it can tolerate different preservation methods and is able to grow at refrigerator temperatures. Listeriosis is hazardous particularly to individuals with lowered immunity.

In the experimental part of this work, different kinds of ready-to-eat (RTE) food products were observed for the occurrence of *L. monocytogenes*. Data for this work covered nation-wide listeria surveys from the years 2004, 2008–2009, 2011 and 2012 and one EU-wide listeria survey from the year 2010. There were three studied food categories: salt cured and cold-smoked fish products, vacuum or modified atmosphere packed sliced meat products, raw milk and blue cheeses. The study was conducted by using statistical methods and by simulating the concentrations of *L. monocytogenes* from the day of the study to the end of the storage period.

Prevalence of *L. monocytogenes* was the highest in salt cured and cold-smoked fish products. Prevalence was even higher, if the product had been packed under vacuum or modified atmosphere or if it was sliced. Raw milk had smaller prevalence of *L. monocytogenes* than fish products and meat products had almost negligible prevalence. There were no positive samples among blue cheese. According to law, the concentration of *L. monocytogenes* should not exceed 100 cfu/g. The only food category that did not fulfil this criterion was fish products although there were only few samples that exceeded this limit. However, the concentration can increase if the storage temperature is too high. On the basis of the simulations, even a small concentration of *L. monocytogenes* can grow to significant amounts during storage.

Based on these results, exposure was qualitatively assessed to be the highest in salt cured and cold-smoked fish products. The small consumption of these products diminished the exposure nevertheless. The larger consumption of raw milk increased exposure even though the prevalence and concentration were lower, respectively. The exposure to *L. monocytogenes* from meat products was assessed to be almost negligible.

Keywords *Listeria monocytogenes*, risk assessment, exposure assessment

Esipuhe

Tämä diplomityö tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviralle Altistus mikrobiologisille ja kemiallisille elintarvikevaaroille (BIKE) -projektia varten.

Haluan kiittää Evirasta ohjaajaani Pirkko Tuomista mahdollisuudesta tehdä tämä diplomityö mielenkiintoisen aiheen parissa. Kiitos myös rakentavista kommenteista ja ohjauksesta, jota diplomityöni aikana sain. Lisäksi haluan kiittää Antti Mikkellä avusta tilastollisten menetelmien käytössä. Kiitos vielä koko riskinarviointiyksikölle siitä, että otitte minut osaksi työyhteisöänne.

Kiitos myös Aalto-yliopiston Kemian tekniikan korkeakoulusta valvojalleni professori Simo Laaksolle ja Marjatta Vahvaselälle neuvoista ja ohjauksesta, jota olen saanut niin diplomityöni kuin aiempien opintojeni kohdalla.

Lopuksi haluan vielä kiittää perhettäni ja ystäviäni, jotka ovat tukeneet minua opintojeni aikana.

Petra Pasonen

Helsingissä 03.03.2015

Sisällysluettelo

| | | |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| | KIRJALLISUUSOSIO | 2 |
| 2 | Mikrobiologinen riskinarviointi elintarvikkeille | 2 |
| 2.1 | Vaaran tunnistaminen..... | 3 |
| 2.2 | Vaaran kuvaaminen..... | 4 |
| 2.3 | Altistuksen arviointi..... | 8 |
| 2.4 | Riskin kuvaaminen..... | 10 |
| 2.5 | Riskinarvioinnin muoto | 11 |
| 3 | <i>L. monocytogenes</i> -bakteerin ominaisuudet | 14 |
| 3.1 | <i>L. monocytogenes</i> listerioosin aiheuttajana | 15 |
| 3.2 | <i>L. monocytogenes</i> -bakteerin kestävyys erilaisissa olosuhteissa..... | 19 |
| 3.3 | Listerioosin ja <i>L. monocytogenes</i> -bakteerin esiintyminen Suomessa ja muualla Euroopassa..... | 24 |
| 3.4 | <i>L. monocytogenes</i> -bakteeriin liittyvä lainsäädäntö | 29 |
| | KOKEELLINEN OSIO | 31 |
| 4 | Kokeellisen osion tavoitteet | 31 |
| 5 | Materiaali ja perusaineisto | 31 |
| 5.1 | Graavisuolattujen ja kylmäsavustettujen kalatuotteiden ja raakamaidon tuotanto ja kulutus Suomessa | 32 |
| 5.2 | Elintarvikkeiden <i>L. monocytogenes</i> -pitoisuusaineistot..... | 32 |
| 5.2.1 | Kansallinen listeria 2004 | 33 |
| 5.2.2 | Kansallinen listeria 2008–2009 | 34 |
| 5.2.3 | EU:n <i>L. monocytogenes</i> -kartoitus tietyistä RTE-ruoista vuodelta 2010 | 35 |

| | | |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2.4 | <i>L. monocytogenes</i> raakamaidossa 2011 | 37 |
| 5.2.5 | Lihavalmisteiden listeriaprojekti (EVO) 2012–2014 | 38 |
| 5.2.6 | Patogenix-tiedonhallintajärjestelmä | 39 |
| 6 | Tutkimusmenetelmät ja tutkimuksen suoritus..... | 40 |
| 6.1 | Tilastolliset menetelmät..... | 41 |
| 6.2 | Määrittämissuorituksen alapuolelle jäävien pitoisuuksien käsittely | 41 |
| 6.3 | Mikrobien kasvun mallintaminen | 42 |
| 6.3.1 | Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP) | 42 |
| 6.3.2 | Combase..... | 43 |
| 6.3.3 | Mallintamisen suoritus pitoisuustiedoista | 43 |
| 7 | Tulokset ja tulosten tarkastelu | 46 |
| 7.1 | <i>L. monocytogenes</i> -bakteerin esiintyminen elintarvikkeissa Patogenixin perusteella .. | 46 |
| 7.2 | <i>L. monocytogenes</i> -bakteerin esiintyminen kalavalmisteissa | 49 |
| 7.3 | <i>L. monocytogenes</i> -bakteerin esiintyminen lihatuotteissa | 52 |
| 7.4 | <i>L. monocytogenes</i> -bakteerin esiintyminen maitotuotteissa | 53 |
| 7.5 | Mallintaminen FSSP- ja Combase-malleilla | 55 |
| 7.5.1 | <i>L. monocytogenes</i> -bakteerin kasvu kohde-elintarvikkeissa | 55 |
| 7.5.2 | Säilytyslämpötilan vaikutus <i>L. monocytogenes</i> -bakteerin kasvuun | 57 |
| 7.6 | Tutkittujen elintarvikkeiden aiheuttama <i>L. monocytogenes</i> -altistuksen taso suomalaisille..... | 63 |
| 8 | Johtopäätökset | 65 |
| | Lähteet | 69 |

1 Johdanto

Listeria monocytogenes on yleisesti maaperästä löytyvä patogeeni, jota esiintyy useissa elintarvikkeissa. Kyseisen bakteerin aiheuttama sairaus, listerioosi, on vaarallinen etenkin henkilöille, joiden immuniteetti on alentunut (Farber & Peterkin, 1991). Listerioositapausten määrä on ollut lievässä nousussa viime vuosina siitäkin huolimatta, että riskiryhmiä on ohjeistettu välttämään riskielintarvikkeita ja elintarvikkeiden valvontaa suoritetaan jatkuvasti. Suomessa listerioosi on yleisempi kuin muualla Euroopassa (Anon., 2015). *L. monocytogenes* -bakteerin esiintymistä elintarvikkeissa on seurattu useilla yksittäisillä tutkimuksilla. Kokonaiskuvan luomiseksi tarvitaan kuitenkin myös riskinarviointitutkimusta.

Tämä diplomityö tehdään osana Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Altistus mikrobiologisille ja kemiallisille elintarvikevaaroille (BIKE) -projektia. Projektin päämääränä on kehittää tilastollinen ohjelma tai menetelmä, jolla pystytään määrittämään ihmiselle haitallisten kemikaalien ja mikrobien saantia elintarvikkeista. Tämän diplomityön tarkoituksena oli koota ja analysoida tietoja *L. monocytogenes* -bakteerista BIKE-projektiin liittyen ja antaa kvalitatiivinen altistuksen arvio *L. monocytogenes* -altistuksesta tutkituissa elintarvikeryhmissä.

Työ alkaa kirjallisuusosiolla, jossa käsitellään ensin riskinarviointia yleisellä tasolla. Tarkoituksena on antaa taustatietoa riskinarvioinnista kokeellista osiota varten. Tämän jälkeen siirrytään *L. monocytogenes* -bakteeriin, josta kerrotaan sen ominaisuuksia niin sairauden aiheuttajana kuin elintarvikkeiden kontaminoijana. Kokeellisessa osiossa tarkastellaan erilaisten aineistojen perusteella *L. monocytogenes* -bakteerin esiintymistä sellaisenaan syötävissä (*ready-to-eat*, RTE) kala-, liha- ja maitotuotteissa ja arvioidaan altistuksen määrää näistä elintarvikeryhmistä.

KIRJALLISUUSOSIO

2 Mikrobiologinen riskinarviointi elintarvikkeille

Mikrobiologinen riskinarviointi on osa elintarvikkeiden riskianalyysiä, johon kuuluu lisäksi riskinhallinta ja riskiviestintä. Riskinarvioinnilla tarkoitetaan tieteellistä prosessia, jonka päämääränä on tuottaa tietoa terveydellisen riskin suuruudesta johonkin haluttuun riskinarviointikysymykseen. Riskinhallinta puolestaan tarkoittaa riskin vähentämiseen tähtäävien toimenpiteiden suorittamista ottaen huomioon riskinarvioinnin tulokset. Riskinhallinta ja riskinarviointi ovat toiminnallisesti erotettu toisistaan puolueettomuuden takaamiseksi. Riskiviestintä puolestaan toimii näiden kahden välillä riskinarvioijan ja riskinhallitsijan kommunikaativälineenä. Päätöksentekoprosessin tulee olla läpinäkyvää (Anon., 1999). Riskienhallinnassa noudatetaan varovaisuusperiaatetta: Jos jonkin tuotteen, toiminnan tai käytännön epäillään aiheuttavan riskiä ihmisten terveydelle tai ympäristölle, tällöin suojaavat toimenpiteet otetaan käyttöön jo ennen riskinarvioinnin valmistumista (Olsen & Motarjemi, 2014).

Codex Alimentarius on määritellyt riskinarvioinnin tieteelliseksi prosessiksi, jonka vaiheet ovat vaaran tunnistaminen, vaaran kuvaaminen, altistuksen arviointi ja riskin kuvaaminen. Vaaralla tarkoitetaan yleisesti elintarvikkeessa olevaa kemiallista ainetta, fysikaalista tai biologista tekijää tai elintarvikkeen tilaa, joka saattaa vaikuttaa haitallisesti terveyteen. Riskinarviointi voi olla kvalitatiivista, kvantitatiivista tai jokin näiden yhdistelmä. Riskinarvioinnin päämääränä on vastata riskinhallitsijan asettamaan riskinarviointikysymykseen. Siinä on määritelty tarkasti, mitä tietoa riskinarvioinnilla on tarkoitus saavuttaa sekä missä muodossa tulokset ilmoitetaan. Esimerkiksi voidaan arvioida sairauden prevalenssia tai sairauden todennäköisyyttä elintarvikeannosta kohden (Anon., 1999). Riskinarvioinnissa tulisi huomioida tiedon

vaihtelevuus (*variability*) ja epävarmuus (*uncertainty*), joista vaihtelevuus on luonnostaan ominaista mikrobiologisille prosesseille (Anon., 2008a). Vaihtelevuudella kuvataan todellisista fysikaalisista ilmiöistä johtuvaa populaation heterogeenisuutta, jota ei voida eliminoida mittauksia lisäämällä. Epävarmuudella puolestaan tarkoitetaan oikeiden tarkkojen parametrien puutteellista tietoa. Usein kuitenkin näiden erottaminen toisistaan on hankalaa (Nauta, 2000). Tässä osiossa käydään läpi mikrobiologinen riskinarviointi vaiheittain.

2.1 Vaaran tunnistaminen

Riskinarviointiprosessin ensimmäinen vaihe on vaaran tunnistaminen. Sillä tarkoitetaan sellaisten elintarvikkeessa tai elintarvikeryhmässä mahdollisesti esiintyvien vaarojen, joilla saattaa olla terveydellisiä haittavaikutuksia, yksilöimistä. (Anon., 1999). Mikrobiologian tapauksessa vaaralla voidaan tarkoittaa joko patogeenista organismia tai sen tuottamaa toksinia. Tällaisissa tapauksissa vaaran aiheuttaja on yleensä hyvin tunnistettavissa, sillä yleensä kyseessä on jokin ennestään tunnettu elintarvikepatogeeni (Lammerding & Fazil, 2000). Joissakin tapauksissa tutkimuskysymys voidaan suoraan asettaa siten, että vaara on suoraan nimetty siinä (Jouve, 2002). Toinen juuri mikrobiologisille vaaroille tyypillinen seikka on, että oireet ilmenevät usein nopeasti elintarvikkeen nauttimisen jälkeen, verrattuna esimerkiksi joidenkin ruoan kautta välittyvien kemikaalien kroonisille vaikutuksille. Toisaalta osalla mikrobeista voi olla hyvinkin pitkä inkubaatioaika tai jälkitauteja, jotka vaikuttavat pidemmän ajanjakson (Lammerding & Fazil, 2000).

Vaaran tunnistaminen on luonteeltaan kvalitatiivinen prosessi. Sopivia tiedon lähteitä ovat esimerkiksi kliiniset tutkimukset, epidemiologiset tutkimukset ja seuranta, eläinkokeet, mikrobien ominaisuuksien tutkimus sekä mikro-organismien ja niiden ympäristön välisen vuorovaikutuksen tutkimukset. Tietoa voidaan kerätä tieteellisistä

julkaisuista, erilaisista tietokannoista (esimerkiksi elintarviketeollisuudelta, viranomaisilta tai järjestöiltä) ja asiantuntijoilta (Anon., 1999).

Vaikka mikrobiologisessa riskinarvioinnissa vaara on usein selvästi tunnistettavissa, tulisi riskinarviointiprosessissa selvittää, mitkä vaarat ovat realistisia millekin tuotteelle ja missä määrin. Listoista, joihin on koottu kaikki mahdolliset välittäjäelintarvikkeet jollekin tietylle patogeenille, ei välttämättä ole hyötyä, jos vaara on mitättömän pieni suurimmalle osalle tuotteista. Seurauksena työmäärä lisääntyy ja virheiden mahdollisuus kasvaa. Tämän takia on tärkeintä keskittyä kullekin elintarvikkeelle relevantteihin patogeeneihin, tai kullekin patogeenille tyypillisiin elintarvikkeisiin (Brown, 2002a).

2.2 Vaaran kuvaaminen

Vaaran kuvaaminen on määritelty elintarvikkeissa mahdollisesti esiintyvien vaaroihin liittyvien terveydellisten haittavaikutusten ominaisuuksien laadulliseksi ja/tai määrälliseksi selvittämiseksi. Tähän vaikuttavat isännästä, patogeenista ja elintarvikkeesta johtuvat tekijät, joita kutsutaan tautikolmioksi (*disease triangle*). Näitä on käsitelty myöhemmin tässä kappaleessa. Jos mahdollista, vaaran kuvaamisen yhteydessä esitetään kyseisen vaaran annosvaste (Anon., 1999). Annosvasteella tarkoitetaan kvantitatiivista arviota elintarvikkeen mukana nautitun patogeenin määrän ja sairauden todennäköisyyden välillä (Dennis *et al.*, 2002). Annosvasteessa sairautta voidaan kuvata joko sairastumisen tai infektion todennäköisyydellä (Anon., 1999).

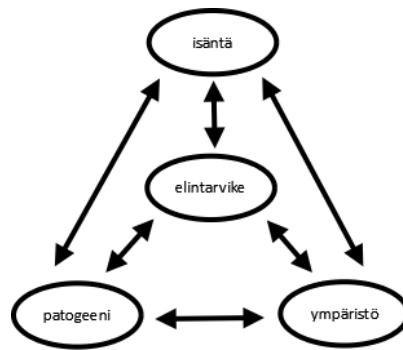
Annosvastekäyrä (sairastumisen todennäköisyys syötyjen bakteerien logaritmin funktiona) on usein s-käyrän muotoinen. Tämä tarkoittaa sitä, että mitä enemmän vaaraa aiheuttavia organismeja elintarvikkeen mukana saadaan, sitä isompi on myös todennäköisyys sairastua (Buchanan *et al.*, 2000). Mitä isompi on solujen määrä, sen todennäköisemmin ne ensin selviävät ihmisen suojamekanismeista, kuten

vatsalaukun happamuudesta ja pääsevät kiinnittymään isompaan määrään sitoutumiskohtaansa suolen pintaan (Teunis *et al.*, 1999). Käyrän muodosta on päätelty, että on olemassa jokin kynnyсарvo, jota ennen mikrobimäärä ei riitä aiheuttamaan sairautta. Tätä kutsutaan pienimmäksi infektoivaksi annokseksi. Kaikille patogeeneille ei ole kuitenkaan pystytty määrittelemään tällaista yksiselitteistä raja-arvoa, vaan tietyille organismeille näyttäisi jopa, että vain yksi solu riittää sairastuttamaan (Buchanan *et al.*, 2000). Esimerkiksi jotkin virukset sairastuttavat jo hyvin pienillä määrillä (Todd, 2014).

Annosvastetta pystytään arvioimaan erilaisista aineistoista, kuten vapaaehtoisilla tehdyistä kokeista, eläinkokeista ja epidemiologisista tutkimuksista. Vapaaehtoisilla tehdyt kokeet tarjoavat totuudenmukaisimman kuvan annosvasteesta, mutta niitä ei monissa tapauksissa, kuten mahdollisesti tappavien tautien kohdalla, pystytä käyttämään. Ongelmana ovat myös liian pienet otannat ja kokeiden suorittaminen nuorilla perusterveillä, jolloin ei saada koko populaatiota kuvaavaa annosvastetta (Buchanan *et al.*, 2000; Dennis *et al.*, 2002). Jos vapaaehtoisia ei ole mahdollista suorittaa, sijalla voidaan käyttää eläinkokeita. Myös niiden käyttöön liittyy monia ongelmia. Sairautta aiheuttava mekanismi ei välttämättä ole samanlainen eläimessä ja ihmisessä ja annos vaatii ekstrapolointia, mikä osaltaan vääristää tulosta. Lisäksi eläinkokeita pyritään nykyään välttämään epäeettisyyden vuoksi (Dennis *et al.*, 2002). Tietyissä tapauksissa myös epidemiologista tietoa pystytään hyödyntämään annosvasteen arvioinnissa. Tämä on mahdollista vain, jos sairauden aiheuttama elintarvike pystytään yksiselitteisesti jäljittämään ja siitä mittaamaan patogeenin pitoisuus (Buchanan *et al.*, 2000).

Ihmiskokulaation vaste tiettyyn patogeeniin on hyvin vaihteleva (Buchanan *et al.*, 2000). Siihen vaikuttavat patogeenin lisäksi isännästä ja elintarvikkeesta sekä sen ympäristöstä johtuvat tekijät (Roberts & Wiedmann, 2002). Niiden vuorovaikutus on monimutkaista ja siksi usein vaikea ottaa huomioon. Nämä kaikki kolme vaikuttavat

siihen todennäköisyyteen, jolla ihmisyksilö sairastuu saatuaan patogeeniä elintarvikkeen mukana (Dennis *et al.*, 2002). Jos yhdenkään näistä kolmesta todennäköisyys on nolla, myös riski on silloin nolla (Anon., 2009a). Vuorovaikutus on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Mikrobiologisen vaaran välittyminen elintarvikkeen kautta ja siihen vaikuttavat tekijät. Muokattu lähteestä Roberts & Wiedmann (2003).

Ensimmäiseksi, eri vaarat aiheuttavat eri tavoilla sairautta ihmisissä. Jotkin patogeenit itsessään aiheuttavat sairautta joutuessaan elimistöön. Ne voivat esimerkiksi tarttua suolen epiteelisoluihin aiheuttaen suolisto-oireita tai tunkeutua kudoksiin aiheuttaen yleistulehdusta (Buchanan *et al.*, 2000). Esimerkiksi listerioosi on tällä tavoin aiheutuva sairaus (Roberts & Wiedmann, 2003). Toisaalta joidenkin patogeenien pintarakenteet voivat olla myrkyllisiä, ne voivat alkaa tuottamaan toksineja tarttuessaan suolen soluihin tai ne voivat erittää ympäristöönsä toksineja (Buchanan *et al.*, 2000). Jälkimmäiseen ryhmään kuuluu esimerkiksi *Clostridium botulinum* -bakteerin tuottama neurotoksiini botuliini (Sugiyama, 1951). Annosvaste voidaan määrittää joko itse patogeenille tai sen muodostamalle toksiinille. Jokaisella patogeenilla on vielä erikseen virulenssitekijöitä, joiden takia saman lajin eri kannat voivat aiheuttaa erilaisen vasteen ihmispopulaatiossa. Virulenssitekijät voivat olla erilaisia mikrobin fyysisiä ominaisuuksia, kuten pintarakenteita, jotka auttavat mikrobia tarttumaan isäntäsoluun, kyky tuottaa toksineja tai resistenssi

antimikrobisille aineille. Virulenssitekijät esiintyvät usein kromosomien ulkopuolisessa DNA:ssa, jolloin ne voivat helposti siirtyä lajilta toiselle tai kannalta toiselle (Buchanan *et al.*, 2000).

Tautikolmion toinen kulma on ihmisestä eli isännästä johtuvat seikat. Tällä tarkoitetaan sitä, että eri ihmiset reagoivat patogeeneihin eri tavalla. Tekijät kuten yksilön ikä, sukupuoli, perimä, yleiskunto ja lääkitykset vaikuttavat siihen, sairastutaanko tautiin ja miten vakavat oireet ovat (Dennis *et al.*, 2002). Esimerkiksi vanhuksilla, hyvin nuorilla lapsilla ja vakavia kroonisia tauteja sairastavilla saattaa olla heikko tai heikentynyt immunitetti, minkä takia näitä pidetään riskiryhminä elintarvikkeiden välityksellä tarttuvien tautien kannalta. Ihmiset eroavat toisistaan geneettisen variaation vuoksi. Esimerkiksi *Helicobacter pylori* -bakteerin kyky aiheuttaa sairautta ihmisissä riippuu ihmisen veriryhmästä (Carlos de Maltos *et al.*, 2002; Boren *et al.*, 1993).

Kolmanneksi myös elintarvike, jonka välityksellä patogeeni leviää, vaikuttaa sairauden ilmenemiseen (Foegeding, 1997). Esimerkiksi elintarvikkeen kohtuullinen happopitoisuus saattaa vaikuttaa patogeenin kykyyn selviytyä mahalaukun happamassa ympäristössä. Ainakin *Salmonella*-suvun bakteereilla ja *L. monocytogenes* -bakteerilla on todettu kyky adaptionautua elintarvikkeessa happamaan ympäristöön, jolloin niillä on suurempi todennäköisyys selviytyä mahalaukun olosuhteista suolistoon ja siten aiheuttaa tehokkaammin sairautta. Toinen mahdollisuus on, että elintarvike muuttaa vatsalaukun ympäristöä siten, että se on mikrobille vähemmän haitallinen. Esimerkiksi vatsalaukun hapon neutralointi saattaa helpottaa mikrobien pääsyä elimistöön. (Buchanan *et al.*, 2000). Myös vastakkaiset vaikutukset ovat mahdollisia. Sprong *et al.* (1999) suorittamissa rotilla tehdyissä kokeissa on huomattu, että suuri maitorasvan kulutus auttaa suojaamaan listerioosilta, minkä on arveltu johtuvan kehon tuottamien lipaasien antibakteerisista vaikutuksista *L. monocytogenes* -bakteereihin (Sprong *et al.*, 1999).

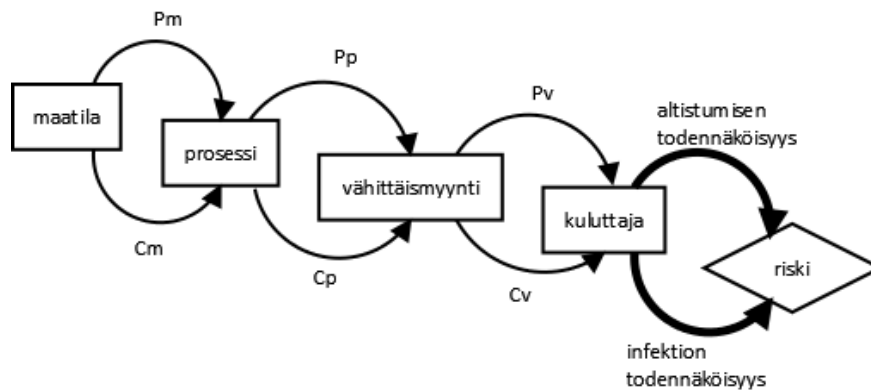
2.3 Altistuksen arviointi

Altistuksen arvioinnin tavoitteena on elintarvikkeen tai muun merkittävän altistuslähteen kautta saatavien vaarojen todennäköisen saannin laadullinen ja/tai määrällinen arviointi. Altistuksen arvioinnin tulee tarjota vastaus riskinarviointikysymykseen. Altistusta voidaan arvioida esimerkiksi tarkastelemalla vaaran kontaminaatiotasoa jossakin tietyssä elintarvikkeessa ja yhdistämällä tiedot tämän elintarvikkeen kulutukseen (Anon., 1999). Altistuksen arvioinnissa tulisi pohtia tekijöitä, jotka vaikuttavat altistukseen, kuten miten usein tuotetta kulutetaan, mitkä ovat mahdollisia kontaminaatioreittejä kussakin vaiheessa ja mitkä tekijät vaikuttavat mikrobien määrään (Anon, 2008). Mikrobiologinen altistuksen arviointi eroaa kemiallisesta siinä, että mikrobien määrä elintarvikkeessa voi vaihdella ajan myötä. Määrä voi joko nousta kasvun myötä tai laskea, kun mikrobit kuolevat (Lammerding & Fazil, 2000).

Tietoa altistuksen arviointivaiheeseen voidaan kerätä monenlaisista lähteistä. Julkaistun materiaalin lisäksi lähteinä voidaan käyttää asiantuntijoita ja zoonosisairauksissa jopa eläinten terveystietoa. Eräs tärkeä ryhmä ovat elintarvikkeiden valvontatulokset. Lisäksi joissakin tapauksissa voidaan hyödyntää epidemiologista dataa. Tiedon käytössä tulisi kiinnittää huomiota erityisesti siihen, miten hyvin se kuvaa todellista tilannetta. Epäedustavan tiedon käyttö tulisi huomioida myöhemmissä arvioinneissa (Lammerding & Fazil, 2000). Useimmiten saatavilla oleva tieto on ainakin jossain määrin epäedustavaa: tähän vaikuttavat patogeenien alhainen prevalenssi raaka-aineissa ja puutteet niiden havaitsemismetodeissa (Brown, 2002b).

Erityisen hyödyllistä tietoa saadaan niin sanotusta pelloilta pöytään -periaatteella (*farm to fork*) tehdystä tutkimuksesta. Periaatteena on kerätä ja analysoida dataa jokaisesta vaiheesta, jossa patogeenin on mahdollista päästä elintarvikkeeseen tai lisääntyä, vähentyä siinä tai eliminoidua siitä. Tämän tarkastelun tulisi yltää aina

alkutuotannosta siihen hetkeen asti, jolloin elintarvike kulutetaan. Jotta kaikki osa-alueet tulisi käsiteltyä, tuotantoketju jaetaan osiin. Esimerkiksi alkutuotannossa ja raaka-aineen kuljetuksessa mahdolliset kontaminaatiot ja niiden määrä tulee selvittää. Prosessointia tarkastellessa tulee ottaa huomioon kaikki käytetyt raaka-aineet, niiden käsittelyt (esimerkiksi lämpökäsittely, jäähdytys, viipalointi) ja pakkaaminen (Brown, 2002b). Valmiin tuotteen kuljetus, säilytys ja valmistus vaikuttavat kaikki myös omalta osaltaan mikrobien määrään. Tämä prosessi on esitetty kuvassa 2. Joissakin erityistapauksissa voidaan käsitellä myös pelkästään jotakin tunnettua riskiksi tiedettyä vaihetta, kuten jälkikontaminaatiota, joka tiedetään isoimmaksi riskiksi *L. monocytogenes* -bakteerin kannalta kypsennetyissä RTE-ruoissa (Lammerding & Fazil, 2000). Usein pellolta-pöytään -periaatteella kerättyä tietoa on kuitenkin mahdotonta saada tiedon liian yksityiskohtaisuuden vuoksi. Ongelmaksi voi myös muodostua liian yksityiskohtaisen tiedon kohdalla virheiden mahdollisuuden kasvaminen.



Kuva 2. Pellolta pöytään -periaate. P kuvaa vaaran prevalenssia eri vaiheissa ja C vaaran pitoisuutta eri vaiheissa. Muokattu lähteestä Lammerding & Fazil (2000).

Mikrobeille ja etenkin bakteereille on tyypillistä, että niiden määrä elintarvikkeissa vaihtelee ajan funktiona. Määrä saattaa joko pysyä samana, vähentyä tai lisääntyä ympäröivien olosuhteiden mukaan. Tähän vaikuttavat kaikki käsittelyt, kuljetukset ja

säilytykset, joita elintarvikkeelle tehdään. Usein prosessionnilla pyritään vähentämään mikrobien määrää, kun taas säilytyksen aikana niiden määrä kasvaa. Samassa elintarvikkeessa mikrobien määrä saattaa siis esimerkiksi ensin vähentyä ja sitten kasvaa (Anon., 2008a).

Riskinarvioinnin kannalta tämä on ongelmallista, sillä pitoisuustietoa saadaan tyypillisesti kerättyä vain yksittäisistä mittauspisteistä. Apuna voidaan käyttää ennustavia malleja. Niiden avulla voidaan esimerkiksi selvittää, miten suureksi patogeenien määrä saattaa kasvaa elintarvikkeessa tai miten ympäristöolot tai säilöntäaineet vaikuttavat patogeenien määrään (Foegeding, 1997). Mallin tulisi aina olla tarkoitukseensa sopiva. Elintarvikkeille tulisi kehittää omat mallit bioprosessitekniesten sijaan, sillä niissä olosuhteet ovat hyvin erilaiset (Baranyi & Roberts, 1994). Ihannetapauksessa mallin tulisi perustua elintarvikkeilla tehtyihin kokeisiin, sillä erilaisilla alustoilla mikrobit voivat kasvaa eri tavalla (Anon., 2008a).

2.4 Riskin kuvaaminen

Riskin kuvaaminen on määritelty tunnettujen tai mahdollisten tietystä väestönosassa esiintyvien haittavaikutusten esiintymistodennäköisyyksien ja voimakkuuksien laadullisiksi ja/tai määrällisiksi arvioinneiksi, jotka perustuvat vaaran tunnistamiseen, vaaran kuvaamiseen sekä altistuksen arviointiin, ja jossa on otettu huomioon epävarmuustekijät. Riskin kuvaamisessa yhdistetään tiedot vaaran tunnistamisesta, vaaran kuvaamisesta ja altistuksen arvioinnista. Päämääränä riskin kuvaamisessa on saada riskiestimaatti, joka kuvaa kvalitatiivisesti ja/tai kvantitatiivisesti todennäköisyyttä ja vakavuutta, jolla tunnettu tai mahdollinen terveysvaikutus ilmenee tietystä populaatiossa. Riskiestimaatti sisältää myös kuvauksen tähän liittyvistä epävarmuuksista (Anon., 1999). Tämän lisäksi riskin kuvaamisen tulisi sisältää arvio tutkimuksen luottamustasosta ja tehdä yhteenveto vaaran kuvaamisen

ja altistuksen arvioinnin yhteydessä tehdyistä kriittisistä oletuksista ja päätöksistä, jotka voivat vaikuttaa lopputulokseen (Buchanan *et al.*, 2000).

Kvantitatiivinen riskin kuvaaminen on kvalitatiivista suositellumpi vaihtoehto. Tämä on suositellumpi siksi, että kvantitatiivinen antaa tarkempaa tietoa, olettaen ettei tieto sisällä virheitä (Anon., 2008a). Kvalitatiivista riskin kuvaamista voidaan kuitenkin soveltaa tietyissä tapauksissa. Esimerkiksi annosvasteen tarkka määrittäminen on usein vaikeaa ja se joudutaan korvaamaan esimerkiksi asiantuntijoiden mielipiteillä (Voysey *et al.*, 2002). Lisäksi sitä voidaan käyttää tilanteissa, joissa riskiarviota tarvitaan nopeasti tai tilanteissa, joissa kvantitatiivinen arvioiminen on mahdotonta, esimerkiksi tiedon tai laskennallisten työkalujen puutteessa (Anon., 2008a).

2.5 Riskinarvioinnin muoto

Riskinarviointiin voidaan käyttää monenlaisia menetelmiä, jotka voivat olla kvalitatiivista, kvantitatiivista tai useimmiten jokin näiden yhdistelmä. Kvalitatiivinen arviointi on tiedon kuvailevaa tai luokittelevaa käsittelyä, kun taas kvantitatiivisessa käytetään apuna matemaattisia analyysejä. Kvalitatiiviseen arviointiin turvaudutaan usein, kun saatavilla ei ole tarpeeksi tai tarpeeksi laadukasta tietoa matemaattista tarkastelua varten. Tapahtuman todennäköisyyttä ja vakavuutta voidaan kuvailla joillakin määrää ilmaisevilla termeillä kuten ”merkityksetön”, ”alhainen”, ”keskinkertainen” ja ”suuri”. Näille määreille on valikoitava tarkoin noudatettavat kriteerit väärinymmärrysten välttämiseksi (Anon., 2008a). Esimerkiksi Huss *et al.*, 2000 käyttivät tutkimuksessaan apuna taulukkoa, jossa vaaran suuruutta kuvattiin +-merkkien avulla. Erilaiset vaaratekijät oli listattu taulukon sarakkeisiin. Mitä enemmän jokin tuote sai +-merkkejä rivilleen, sitä korkeampi oli sen riski. Vaaratekijöitä oli esimerkiksi patogeenien kyky kasvaa kyseisessä tuotteessa tai lämpökäsittelyjen puute (Huss *et al.*, 2000). Jos esimerkiksi eri asiantuntijoiden tekemien arviointien

halutaan olevan vertailukelpoisia toisiinsa nähden, termit tulisi ankkuroida johonkin mitattavaan ilmiöön, kuten tiettyyn sairauden prevalenssiin (Anon., 2008a).

Kvalitatiivisesta analyysistä on myös mahdollista tehdä puolikvantitatiivinen. Periaatteena on muuttaa kvalitatiivinen tieto jollakin ennalta määrättyllä tavalla kvantitatiiviseksi. Esimerkiksi Ross ja Sumner (2002) käyttivät kehittämässään riskinarviointityökalussa erilaisia painokertoimia kuvaamaan riskiä esimerkiksi sen mukaan, miten suuri sairauden kuolleisuus on, miten suuri on riskiryhmä, kuinka usein ja kuinka suurella annoksella altistutaan ja miten ruoka prosessoidaan tai valmistetaan sekä muilla vastaavilla kysymyksillä. Tuloksena saatiin lukuarvo nollan ja sadan väliltä sen mukaan, miten iso arvio riskille sairastua on tietyssä populaatiossa (Ross & Sumner, 2002). On kuitenkin huomattava, että tällainen menettely ei tuo lisätietoa kvalitatiiviseen arvioon verrattuna. Hyötynä on, että tulosten käsittely helpottuu, kun kvalitatiivinen arvio saadaan käännettyksi numeroarvoiksi.

Kvantitatiivisessa arvioinnissa käytetään usein joko piste-estimointia (deterministinen), stokastisia menetelmiä (todennäköisyysjakaumat), iterointimenetelmiä, kuten Monte Carlo -simulaatiota tai yhä enemmän yleistyvää bayesilaista tilastotiedettä. Piste-estimoinnissa käytetään yksittäisiä jakauman arvoja kuvaamaan mallin muuttujia. Käytettävä arvo voi olla esimerkiksi keskiarvo, korkein arvo, useimmiten havaittu arvo tai 95 % otoksesta kuvaava arvo sen mukaan, mitä halutaan mallintaa. Muuttujalla tarkoitetaan esimerkiksi mikrobien määrää ruoassa, logaritmista vähentymistä kypsennyksen aikana tai annoskokoa. Nämä piste-estimaatit yhdistetään matemaattisen mallin mukaan kuvaamaan altistuksen piste-estimaattia. Valittujen arvojen mukaan estimaatti on esimerkiksi joko huonoin mahdollinen tapaus, keskiarvo tai paras mahdollinen tapaus (Anon., 2008a). Laskentatavasta johtuen piste-estimoinnissa menetetään osa tiedosta (Lammerding & Fazil, 2000). Koska piste-estimoinnissa pyritään usein valitsemaan ”varman päälle” -arvio kullekin muuttujalle, on tuloksena helposti liian korkea arvio. Näin

todennäköisyys sille, mikä on mahdollisimman realistinen arvio, jää havaitsematta (Anon., 2008a).

Piste-estimointia realistisemman arvion antava vaihtoehto on todennäköisyysjakauma. Toisin kuin piste-estimoinnissa, todennäköisyysjakaumissa voidaan käsitellä suurta tietomäärää kerralla, jolloin tieto vaihtelusta ei katoa. Mallin sisääntuloina käytetään koko todennäköisyysjakautta kullekin muuttujalle. Jakaumat kootaan perustuen empiiriseen dataan tai tietoon jostakin biologisesta ilmiöstä (Lammerding & Fazil, 2000). Vastaavasti ulostuloksi saadaan todennäköisyysjakauma, joka kuvaa yksilön tai populaation vaaran vaihtelualueita ja jokaisen altistustason todennäköisyyttä. Stokastisten mallien haittapuolena on niiden monimutkaisuus ja vaikeus saada ratkaisu analyyttisesti matemaattisin keinoin. Samaa periaatetta voidaan kuitenkin soveltaa myös numeerisille menetelmille, joista käytetyin on Monte Carlo -simulaatio (Anon., 2008a).

Monte Carlo -simulaatio on numeerinen menetelmä, jonka etuna on, että se on tietokoneella tehtynä nopeampi menetelmä kuin analyyttiset menetelmät. Monte Carlo -simulaatio perustuu siihen, että jokaisesta sisääntulotodennäköisyysjakaumasta valitaan satunnaisesti yksi piste-estimaattiarvo. Näitä arvoja käytetään laskemaan riskinarviointimallin mukaisen matemaattisen yhtälön avulla ratkaisu, joka tallennetaan. Tämä menettely toistetaan useita kertoja, jolloin jakaumissa useammin esiintyvät arvot tulevat valikoiduiksi useammin. Iteroinnin tuloksena saadaan todennäköisyysjakauma halutulle ulostulolle (Lammerding & Fazil, 2000).

Riskinarvioinnissa hyödynnetään yhä enemmän bayesilaista tilastotiedettä. Bayesilainen verkko on graafinen esitys joidenkin muuttujien todennäköisyysuhteille. Itse verkko koostuu solmuista (*node*), jotka edustavat muuttujia sekä kaarista (*arc*), jotka edustavat näiden välisiä riippuvuussuhteita. Verkko on suunnattu, eli solmut yhdistyvät toisiinsa kaarilla (vanhempi- ja

lapisolmut, *parent* ja *child*) ja asyklinen, eli solmusta ei ole reittiä takaisin itseensä. Näistä ominaisuuksista syntyy verkon rakenne. Solmuihin liitetään todennäköisyysfunktio, jonka arvot riippuvat vanhempisolmujen arvoista bayesin kaavan (1) mukaan. Altistuksen arvioinnissa bayesilaisten verkkojen avulla voidaan mallintaa esimerkiksi mikrobien pitoisuusjakaumaa. Etuna muihin menetelmiin verrattuna on etenkin se, että mallinnus on joustavaa, sillä pystytään mallintamaan monimutkaisia systeemejä, epävarmuutta pystytään käsittelemään ja tuntemattomille muuttujille pystytään määrittämään jakauma (Phan *et al.*, 2010).

$$P(B|A) = \frac{P(A|B)P(B)}{P(A)} \quad (1)$$

Missä

$P(B|A)$ on tapahtuman A todennäköisyys ehdolla B

$P(A|B)$ on tapahtuman B todennäköisyys ehdolla A

$P(A)$ on tapahtuman A priori-todennäköisyys

$P(B)$ on tapahtuman B priori-todennäköisyys

3 *L. monocytogenes* -bakteerin ominaisuudet

Tämä osio käsittelee *L. monocytogenes* -bakteeria siltä osin, mikä on olennaista riskinarvioinnin näkökulmasta. Ensin käsitellään bakteerin kykyä aiheuttaa sairautta ihmisessä sekä sairauden yleisyyttä. Toiseksi käsitellään *L. monocytogenes* -bakteerin kykyä kasvaa erilaisissa olosuhteissa. Riskinarvioinnissa tulee tietää, miten suuri määrä patogeeniä tarvitaan aiheuttamaan sairautta, millaisia reittejä pitkin patogeeni voi joutua elintarvikkeeseen ja missä elintarvikkeissa sitä esiintyy sekä miten se

käyttäytyy näissä. Lopuksi vertaillaan listerioosin yleisyyttä Suomessa ja muualla Euroopassa sekä kerrotaan *L. monocytogenes* -bakteeriin liittyvästä lainsäädännöstä.

3.1 *L. monocytogenes* listerioosin aiheuttajana

Listeria-sukuun kuuluu kuusi lajia, mutta *L. monocytogenes* on ainoa, jonka tiedetään aiheuttavan sairautta eli listerioosia ihmisellä, muutamia poikkeustapauksia lukuun ottamatta. Lisäksi *L. ivanovii* voi aiheuttaa sairautta joissakin eläimissä (Roberts & Wiedmann, 2002). *L. monocytogenes* on gram-positiivinen, itiöimätön fakultatiivinen anaerobi, jolla on laaja kasvualue, noin 0–50 °C. Se on katalaasiposiitivinen, oksidaasinegatiivinen ja hemolyyttinen (Wareing *et al.*, 2010). *L. monocytogenes* esiintyy yleisesti maaperässä. Sitä löytyy runsaasti erityisesti alueilta, joissa on läsnä maatuivia kasvinosia. Myös villieläinten keskuudessa tavataan *L. monocytogenes* -bakteeria (Weis & Seeliger, 1975). Lajilla on 13 serotyyppiä, mutta niistä yleisimmin aiheuttavat sairautta serotyypit 4b, 1/2a ja 1/2b. Suurin osa laajoista epidemioista on aiheutunut serotyypistä 4b (McLauchlin, 2006). Suomessa yleisimmät sairautta aiheuttaneet serotyypit ovat 1/2a ja 4b, jos epidemiatapauksia ei oteta huomioon (Jaakola *et al.*, 2012; 2013; 2014; Hulkko *et al.*, 2010; 2011).

Listerioosia esiintyy kahdessa eri muodossa: tyypillisenä ruokamyrkytyksenä tai verenmyrkytyksenä ja neurologisina oireina (Ryser & Buchanan, 2013). Lisäksi tauti saattaa esiintyä raskaana olevilla naisilla lievinä, flunssamaisina oireina. Tyypillisimmät riskiryhmät ovat vanhukset, raskaana olevat naiset ja vastasyntyneet lapset (McLauchlin, 2006). Yleisesti myös henkilöillä, joilla on esimerkiksi sairauden takia heikentynyt T-solu-välitteinen immunitetti, on suurempi riski sairastua listerioosiin (Ryser & Buchanan, 2013). Terveillä aikuisilla ja lapsilla listerioosi on harvinainen (McLauchlin, 2006). Oireista ruokamyrkytys on tavallisempi terveillä aikuisilla, kun taas riskiryhmillä esiintyy tavallisesti vaarallisempia taudin muotoja

(Roberts & Wiedmann, 2002). Taudissa on melko korkea kuolleisuus, noin 20–25 % (Gerner-Smidt *et al.*, 2005; Ryser & Buchanan, 2013).

L. monocytogenes -bakteerin on tutkittu välittyvän 99 % elintarvikkeiden välityksellä (Mead *et al.*, 1999) Myös muulla tavalla välittyviä listerioositapauksia on raportoitu (McLauchlin *et al.*, 2004). Suurin osa listerioositapauksista on yksittäisiä, mutta myös joitakin listerioosiepidemioita tunnetaan (Farber & Peterkin, 1991). Listerioosissa on pitkä inkubaatioaika, 11–70 päivää (mediaani 30 päivää). Pitkän inkubaatioajan takia taudin aiheuttanutta elintarviketta on vaikea jäljittää. Tämän vuoksi osa epidemiatapauksista saattaa jäädä huomaamatta, etenkin jos tapaukset ovat maantieteellisesti hajallaan (Schuchat, 1991).

Listerioosin suuren kuolleisuuden takia *L. monocytogenes* -bakteerin pienintä infektoivaa annosta ei pystytä määrittämään ihmisillä suoraan. Eläinkokeita on sen sijaan tehty eri eläimillä. Pine *et al.* (1990) tutkivat eri *L. monocytogenes* -kannoilla arvioitua LD50-arvoa (*approximate 50 % lethal dose*, ALD50) hiirillä. ALD50-arvoissa oli suuria eroja, pienin arvo oli 50 ja suurin $4,4 \cdot 10^5$ solua. Määrä riippui sekä käytetystä *L. monocytogenes* -kannasta että tavasta, jolla hiiret oli infektoitu (Pine *et al.*, 1990). Apinoilla tehdyillä eläinkokeilla on sen sijaan huomattu, että soluja tarvitaan isompi määrä sairauden aiheutumiseen. Farber *et al.* (1991) tutkimuksen mukaan sairastumiseen tarvittava määrä jaavanmakaki-apinoilla on 10^9 solua. Lievempiä oireita esiintyi myös apinoilla, jotka olivat saaneet 10^7 *L. monocytogenes* -solua (Farber *et al.*, 1991).

Myös ihmisillä pienimmän infektoivan annoksen on arveltu olevan melko suuri. Tämä arvio on tehty sen perusteella, että vaikka *L. monocytogenes* -bakteeria esiintyy jatkuvasti elintarvikkeissa pieniä määriä, listerioosin esiintyvyys on monia muita elintarvikeperäisiä sairauksia pienempi (Mead *et al.*, 1999). Tätä tukee myös se, että monien epidemioiden yhteydessä aiheuttajaksi epäillystä elintarvikkeesta on löydetty suuria pitoisuuksia. Kuitenkin lähteeksi epäiltyä elintarviketta syöneistä noin 20–50 %

ei sairastu (Aureli *et al.*, 1997; Dalton *et al.*, 1997; Carrique-Mas *et al.*, 2003; Frye *et al.*, 2002). Eräiden epidemioiden aiheuttajiksi epäiltyjen elintarvikkeiden pitoisuuksia on esitetty taulukossa 1.

Etenkin riskiryhmille voi kuitenkin hyvinkin pieni määrä *L. monocytogenes* -bakteereita riittää aiheuttamaan sairautta. Suomessa vuonna 1998–1999 voin sekä Yhdysvalloissa samana vuonna tapahtuneesta nakkien ja RTE-lihojen välityksellä tapahtuneesta epidemiasta tiedetään, että hyvinkin pieni pitoisuus riittää aiheuttaman sairautta. Suomessa 5–60 pmy/g pitoisuus riitti aiheuttamaan listerioosia henkilöillä, joilla oli heikentynyt immuunipuolustus (Lyytikäinen *et al.*, 2000). Yhdysvalloissa osa välittäjäksi epäillyistä elintarvikkeista sisälsi niinkin pienen määrän *L. monocytogenes* -bakteeria kuin 0,3 pmy/g (Mead *et al.*, 2006). Näiden tutkimusten perusteella näyttäisi, että listerioosin aiheutumiseen tarvitaan hyvin vaihteleva määrä *L. monocytogenes* -bakteereja riippuen ihmisten vastustuskyvystä ja *L. monocytogenes* -kannasta. Tätä tukevat myös eläinkokeet, joissa on saatu vaihtelevia tuloksia sairastumiseen tarvittavista *L. monocytogenes* -solujen määrästä.

Taulukko 1. Eräissä listerioosiepidemioissa välittäjänä toimineiden elintarvikkeiden *L. monocytogenes* -pitoisuuksia.

| Vuosi | Välittäjänä toiminut elintarvike | <i>L. monocytogenes</i> -pitoisuus | Sairastuneiden määrä | Lähde |
|-------|----------------------------------|------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1994 | maito | $8,8 \cdot 10^8 - 1,2 \cdot 10^9$ pmy/ml | 45 | Dalton <i>et al.</i> , 1997 |
| 1997 | maissi (salaatissa) | 10^6 pmy/g | 1566 | Aureli <i>et al.</i> , 1997 |
| 1998 | kylmäsavustettu kirjolohi | $1,9 \cdot 10^5$ pmy/g | 5 | Miettinen <i>et al.</i> , 1999 |
| 2000 | RTE-liha | $150 - 2,5 \cdot 10^6$ pmy/g | 31 | Hood <i>et al.</i> , 2002 |
| 2001 | kalkkuna | $1,6 \cdot 10^9$ pmy/g | 16 | Frye <i>et al.</i> , 2002 |
| 2001 | maitotuotteet (voi, juusto) | $30 - 6,3 \cdot 10^7$ pmy/g | 48 | Carrique-Mas <i>et al.</i> , 2003 |

Eri *L. monocytogenes* -kantojen kykyyn aiheuttaa sairautta ihmisellä vaikuttavat virulenssitekijät, joita tunnetaan useita. *L. monocytogenes* -bakteerien tunkeutumisesta isäntäsoluun vastaavat internaliinit, jotka ovat patogeenisten kantojen erittämiä proteiineja (Gaillard *et al.*, 1996). Eräs merkittävimmistä virulenssitekijöistä on hemolysiini, jolla on tärkeä rooli bakteerin selviytymisessä isäntäsolun sisällä. (Beattie *et al.*, 1990; Tilney & Portnoy, 1989). Infektion aikaansaamiseksi bakteerin pitää myös pystyä leviämään isäntäsolusta toiseen, mihin vaikuttaa seuraava virulenssitekijä, fosfolipaasit (Smith *et al.*, 1995). Neljäs virulenssitekijä on aktiiniin perustuva intrasellulaarinen liikkuvuus. Kuten fosfolipaasienkin, sen avulla *L. monocytogenes* -bakteerit pystyvät liikkumaan paremmin isäntäsolujen välillä kudoksissa (Machesky, 1997). Virulenssigeenien ekspression arvellaan käynnistyvän ympäristöstä tulevien signaalien johdosta (Mekalanos, 1992). Altistuminen ääriolosuhteille, kuten alhaiselle pH:lle tai matalalle tai korkealle lämpötilalle näyttäisi *L. monocytogenes* -bakteerin kohdalla aiheuttavan virulenssin lisääntymistä. Ainakin hiirillä happamaan sopeutuneet *L. monocytogenes*

-bakteerit lisäsivät kuolleisuutta villityyppiin nähden. Tutkimuksessa saatiin myös viitteitä siitä, että sopeutuminen happamaan lisää *L. monocytogenes* -bakteerin virulenssia (O'Driscoll *et al.*, 1996). Monet virulenssitekijöistä ovat myös lämpötilasäädelyjä (Leimeister-Wächter *et al.*, 1991). Hiirillä 4 °C kasvaneet *L. monocytogenes* -bakteerit olivat virulentimpia kuin 22 °C kasvaneet bakteerit (Czuprynski *et al.*, 1989). Käsitystä kantojen erilaisista virulensseista tukee myös se, että elintarvikkeissa useimmin esiintyvät serotyypit (kuten 1/2c) vastaavat alle 10 % sairastumisia (Farber & Peterkin, 1991).

3.2 *L. monocytogenes* -bakteerin kestävyys erilaisissa olosuhteissa

L. monocytogenes -bakteerin hävittämisen elintarvikkeista tekee vaikeaksi sen kyky kasvaa hyvinkin erilaisissa olosuhteissa. Sillä on laajat kasvu- ja lämpötilansietoalueet, se pystyy muodostamaan erilaisille pinnoille biofilmejä ja se sietää hyvin erilaisia säilöntäkeinoja, kuten alhaista veden aktiivisuutta, happamuutta tai suojakaasuolosuhteita. *L. monocytogenes* -bakteeria esiintyy luonnostaan monissa elintarvikkeissa ja useimmiten se pystyy hyödyntämään näitä kasvualustanaan. Tässä kappaleessa kerrotaan ensin *L. monocytogenes* -bakteerin kasvusta eri lämpötiloissa ja sen jälkeen erilaisilla pinnoilla tai kasvualustoilla, sisältäen prosessilaitteiden pinnat ja eri elintarvikeryhmät eli maito-, liha- ja kalatuotteet sekä kasvukset ja vihannekset.

L. monocytogenes pystyy kasvamaan hyvin jääkaappilämpötiloissa. Esimerkiksi tuorejuustossa *L. monocytogenes* kasvoi hyvin lämpötiloissa sekä 4 että 10 °C. Molemmissa lämpötiloissa solujen määrä kasvoi noin kuukaudessa tasolle 10^7 pmy/g, kun lähtötilanne oli tasolla 10^2 tai 10^3 pmy/g. Ainoastaan kasvuvauhdissa oli eroa, 10 °C:ssa yläraja saavutettiin nopeammin (Leggett *et al.*, 2012). Membre *et al.* (1999) havaitsivat lisäksi tutkimuksessaan, että *L. monocytogenes* -bakteerilla ei ollut matalissa lämpötiloissa kasvatusliemessä kasvatettuna lag-vaihetta (viiveaika kasvun alussa) eli se alkaa kasvaa heti, kun kontaminaatio tapahtuu (Membre *et al.*, 1999).

L. monocytogenes -bakteerin eliminoimisen elintarvikkeista tekee vaikeaksi sen suuri lämpötilansietoalue. Ainakin yhdessä epidemiatapauksessa bakteerin on tiedetty selvinneen maidon pastöroinnista hengissä ja aiheuttaneen sairastumisia (Fleming *et al.*, 1985). Useissa tutkimuksissa onkin selvinnyt, että vaikka *L. monocytogenes* yleensä kuolee pastörintilämpötilassa, se pystyy selviämään melko korkeista lämpötiloista, kun se ensin altistetaan joksikin aikaa alhaisempaan lämpötilaan. Knabel *et al.* (1990) huomasivat tutkimuksessaan, että sopivalla alustalla ja 45 °C:ssa tapahtuneella tunnin lämpökäsittelyllä oli parantava vaikutus *L. monocytogenes* -bakteerin pastörintilämpötilan kestäkykyyn (Knabel *et al.*, 1990). Sama ilmiö on havaittavissa myös elintarvikematriiseilla. Walshin *et al.* (2001) tutkimuksessa todettiin, että 10 minuutin 48 °C lämpökäsittely auttoi *L. monocytogenes* -bakteeria selviämään 55 °C:n lämpökäsittelystä perunassa, mutta ei kuitenkaan lihassa. Farber & Brown (1990) tutkimuksessa selvisi kuitenkin, että *L. monocytogenes* selviää myös lihassa korkeammassa lämpötilassa, kun adaptaatioaikaa pidennetään kahteen tuntiin (Farber & Brown, 1990).

Laajan lämpötila-alueen lisäksi *L. monocytogenes* -bakteerilla on myös laaja pH:n sietoalue ja se kestää hyvin alhaista veden aktiivisuutta. Kyseinen bakteeri kasvaa pH-välillä noin 5–9. Kasvua saattaa tapahtua happamammassakin ympäristössä muista olosuhteista riippuen (Wareing *et al.*, 2010; Ryser & Buchanan, 2013). *L. monocytogenes* saattaa selviytyä jopa alle pH:ssa 4,3, mutta ei pysty enää kasvamaan (Ryser & Buchanan, 2013). Myös suolankestävyys on hyvä: *L. monocytogenes* kestää jopa 10–12 % suolapitoisuuden elintarvikkeissa (Wareing *et al.*, 2010). Optimikasvualue veden aktiivisuuden suhteen on vähintään 0,97, mutta kasvua tapahtuu aina tasolle 0,90 asti. Jotkin kannat kasvavat jopa silloin, kun veden aktiivisuus on vain 0,83 (Wareing *et al.*, 2010; Ryser & Buchanan, 2013).

Listeria-suvun lajit ovat yleisiä kontaminaation aiheuttajia elintarviketuotantolaitoksissa. Ne pystyvät elämään pitkiäkin aikoja

prosessointiolosuhteissa ja saattavat siten aiheuttaa tuotteiden jatkuvaa kontaminoitumista. 13 tuotantolaitosta (lihan- siipikarjan- ja kalankäsittelylaitoksia) kattaneessa pohjoismaisessa tutkimuksessa havaittiin, että eri tuotantolaitoksista otetuista ympäristönäytteistä (kuljettimet, liukuhihnat, laitteet) 11,9 % olivat kontaminoituneet *L. monocytogenes* -bakteerilla. Siivoustoimenpiteet eivät olleet riittäviä poistamaan kaikkia bakteereita, sillä myös puhtailta pinnoilta otetuista näytteistä 11,5 % oli *Listeria*-positiivisia ja 8,3 % *L. monocytogenes* -positiivisia (Gudbjörnsdóttir *et al.*, 2004). *L. monocytogenes* -bakteerin taipumus kontaminoida tuotantolaitoksia johtuu sen kyvystä muodostaa biofilmejä erilaisille pinnoille. Lundenin *et al.* (2000) tutkimuksessa jopa 1-2 tunnin kontaktiaika riitti biofilmin muodostukseen. Etenkin tietyillä kannoilla, jotka oli eristetty tuotantolaitoksista, lyhytkin kontaktiaika pintaan riitti nostamaan solujen määrää pinta-alaa kohden (Lunden *et al.*, 2000).

Erilaisten pintojen lisäksi *L. monocytogenes* kasvaa yleensä hyvin erilaisissa elintarvikematriiseissa. Se välittyy ihmiselle usein maitotuotteiden kautta. Etenkin pehmeitä juustoja pidetään riskituotteina, sillä bakteerin tiedetään pystyvän kasvamaan niissä. *L. monocytogenes* -pitoisuus voi kasvaa luonnollisesti kontaminoituneissa juustoissa jopa tasolle 10^7 pmy/g. Määrää saattaa vähentää juuston hapatteena käytetty maitohappobakteerikanta, mutta se ei estä kasvua kokonaan (Farber & Peterkin, 1999). Keinoja vähentää *L. monocytogenes* -bakteerin kasvua pehmeissä juustossa on vähän. Juustot ovat usein jo luonnostaan happamia ja suolaisia, mutta tämä ei riitä kokonaan estämään kasvua (Ryser & Buchanan, 2013). Whitey *et al.* (2000) tutkivat suojakaasun merkitystä *L. monocytogenes* -bakteerin kasvulle. Tutkimuksen mukaan suojakaasulla ei ole vaikutusta bakteerin kasvuun, sillä se on metaboliaaltaan niin monipuolinen, että se voi kasvaa juustossa suojakaasuolosuhteissa (Whitley *et al.*, 2000). On jopa ehdotettu, että *L. monocytogenes* saa vakuumi- tai suojakaasupakkauksessa kilpailuedun muihin, aerobisiin bakteereihin verrattuna ja kasvaa siksi näissä paremmin (Brown, 2008).

Erityisen alttiita *Listeria*-suvun bakteereiden kasvamiselle kypsymisen aikana ovat homejuustot. Tämä johtuu siitä, että homeen metabolia muuttaa juuston pH:ta arvosta 4,0–4,5 kohti tasoa 6–7, mikä on riittävän neutraali *Listeria*-suvun bakteereille kasvaa. Erityisesti juuston pinnalla ja sisällä olevissa ilmakuplissa olosuhteet ovat suotuisat *L. monocytogenes* -bakteerille (Pawsey, 2002).

Myös muut maitotuotteet ovat listerioosin kannalta riskituotteita, etenkin, jos ne ovat pastöroimattomasta maidosta valmistettuja (Anon., 2013a). Schwartzman *et al.* (2010) huomasivat tutkimuksessaan, että nestemäinen maito oli hyvä kasvualusta *L. monocytogenes* -bakteerille. pH:n ja veden aktiivisuuden laskulla ei juuri ollut vaikutusta kasvuun (Schwartzman *et al.*, 2010). *L. monocytogenes* pystyy kasvamaan myös jogurtissa, vaikka happamuus inhiboikin kasvua jonkin verran (Gulmez & Guven, 2003; Gahan *et al.*, 1996). Gahanin *et al.* (1996) mukaan *L. monocytogenes* -bakteerilla on kyky adaptoitua happamaan ympäristöön jogurtissa ja muissa sen tapaisissa ruoissa (Gahan *et al.*, 1996). Tämä kyky saattaa auttaa *L. monocytogenes* -bakteeria selviytymään vatsalaukun happamista olosuhteista (O'Driscoll *et al.*, 1996). *Listeria*-suvun lajit välittyvät maitotuotteisiin prosessointilaitosten kontaminoituneiden pintojen ja raakamaidon välityksellä (Ryser & Buchanan, 2013).

Erilaiset lihat ja prosessoidut lihatuotteet ovat mahdollisia *L. monocytogenes* -bakteerin lähteitä. Suurimpia riskituotteita lihojen joukossa ovat erilaiset sellaisenaan ilman kuumennusta syötävät lihatuotteet, kuten patee tai kypsänä siivutetut leikkeleet, sillä *L. monocytogenes* tuhoutuu tuoreista lihoista kypsennyksen aikaisessa kuumentamisessa (Anon., 2013a). Kontaminaatio voi tapahtua joko siten, että bakteeria esiintyy eläimen lihaksessa jo teurastuksen hetkellä tai liha voi jälkikontaminoitua (Farber & Peterkin, 1999). Jälkikontaminaatiolla tarkoitetaan lihan kypsytyksen jälkeisessä käsittelyssä (esimerkiksi siivutus) tapahtuvaa kontaminaatiota. Mahdollisia tartunnan lähteitä ovat esimerkiksi prosessityöntekijät sekä prosessilaitteet ja -kuljettimet (Nesbakken *et al.*, 1996).

Happamuudella ja lihan laadulla on suuri vaikutus siihen, miten hyvin *L. monocytogenes* kasvaa lihassa. Glass ja Doyle (1989) huomasivat tutkimuksessaan, että *L. monocytogenes* kasvaa hyvin lihassa, jonka pH on 6 tai enemmän, mutta huomattavasti vähemmän lihoissa, joiden pH on luokkaa 5 tai alle. Lihan laatu vaikutti siten, että *L. monocytogenes* kasvoi hyvin erityisesti siipikarjan lihassa, kinkuissa ja tietyissä makkaroissa. Tietyissä makkaroissa ja paistilihassa *L. monocytogenes* -bakteerin määrä taas pysyi samalla tasolla tai jopa väheni tietyillä aikaväleillä. Kasvuun vaikuttivat pH:n lisäksi muun muassa kudoksen tyyppi, inhibitoriset yhdisteet ja suolapitoisuus. Tutkimukset suoritettiin jääkaappilämpötilassa ja *L. monocytogenes* siirrostettiin lihaan (Glass & Doyle, 1989). Yleisesti lihatuotteista voidaan todeta, että niissä *L. monocytogenes* -bakteeria esiintyy pienempiä määriä kuin yleensä pehmeissä juustoissa (Farber & Peterkin, 1991).

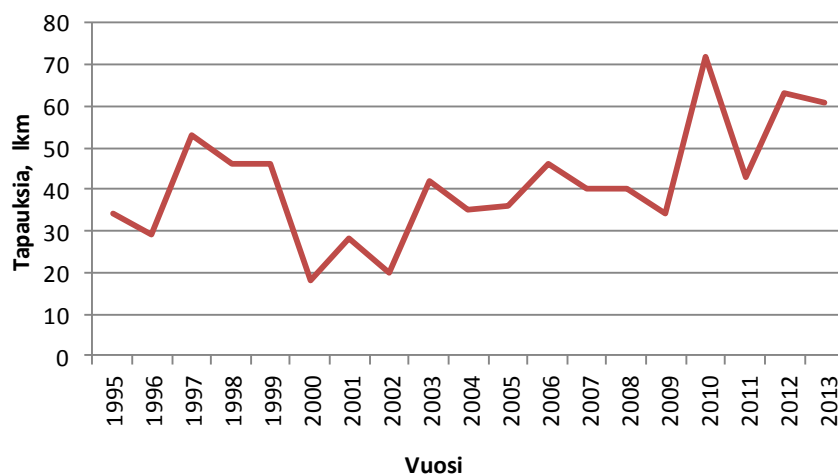
Kalatuotteista etenkin sellaisenaan syötäviä ja vakuumpakattuja savustettuja tuotteita pidetään riskielintarvikkeina listerioosin kannalta (Anon., 2013a). Esimerkiksi savustetussa lohessa *L. monocytogenes* -bakteeria esiintyy melko usein. Cortesi *et al.* (1997) tutkimuksen kolmesta erästä kaupallista savulohta löytyi *L. monocytogenes* -bakteeria 19,3 % näytteistä. Pitoisuudet olivat kuitenkin melko pieniä, alle 10 pmy/g. Jos tuotteita kuitenkin säilytettiin 60 päivää 2 °C:ssa tai 30–40 päivää 10 °C:ssa, määrä kasvoi huomattavasti (Cortesi *et al.*, 1997). Käsittelyillä, kuten savustamisella tai marinoinnilla ei juuri ole vaikutusta *L. monocytogenes* -bakteerin kasvuun (Cortesi *et al.*, 1997; Guyer & Jemmi, 1991). *L. monocytogenes* -bakteerin esiintyminen ei vaikuttanut savulohen aistinvaraiseen laatuun eli näytteistä ei pystynyt näkemään kontaminaatiota (Cortesi *et al.*, 1997).

Koska *Listeria*-suvun lajit ovat maaperässä esiintyviä bakteereja, myös vihannekset ovat mahdollisia lähteitä. Heisick *et al.* (1989) löysivät eri *Listeria*-lajeja muun muassa kaalista, kurkusta, perunasta, retiisistä, sienistä ja lehtisalaatista. *L. monocytogenes* -bakteeria löytyi kuitenkin merkittäviä määriä ainoastaan perunoista ja retiiseistä.

Pääasiallinen *L. monocytogenes* -serotyyppi vihanneksissa oli 1, jota ei yleensä ole yhdistetty listerioosiin (Heisick *et al.*, 1989). Suurimpana riskituotteena kasvisten ja vihannesten joukossa pidetään valmissalaatteja (Anon., 2013a). *L. monocytogenes* selviää hyvin pakastamisesta, joten myös pakastevihanneksissa on listerioosiriski (Palumbo & Williams, 1991).

3.3 Listerioosin ja *L. monocytogenes* -bakteerin esiintyminen Suomessa ja muualla Euroopassa

Suomessa on vuosina 1999–2013 ollut kolme listerioosiepidemiaa: vuonna 1999 (Hatakka & Halonen, 2000), 2006 (Niskanen *et al.*, 2007) ja 2012 (Lyytikäinen *et al.*, 2013). Näistä viimeinen on tosin ainoastaan epäily. Epidemioissa sairastuneita on ollut 10–25. Välittäjinä olivat toimineet voi, sienisalaatti ja lihahyytelö (viimeisin ainoastaan epäily). Yksittäistapauksia oli ollut 18–72 vuosina 1995–2013 (kuva 3). Yli puolet listerioosiin sairastuneista olivat vähintään 65-vuotiaita. Muita riskiryhmiä ei tilastoida tartuntatautirekisteriin (Jaakola *et al.* 2012–2014; Hulkko *et al.* 2010; 2011). Kuvasta 3 nähdään, että listerioositapausten määrä on ollut lievässä nousussa vuosien 1995–2013 aikana. Kasvu oli tilastollisesti merkitsevää ($p=0,028$; lineaarinen regressio, olettaen että väestön määrä on vakio, katso kappale 6.1).



Kuva 3. Listerioositapaukset Suomessa vuosina 1995–2013 sisältäen sekä yksittäistapaukset että epidemiat (Anon., 2014a).

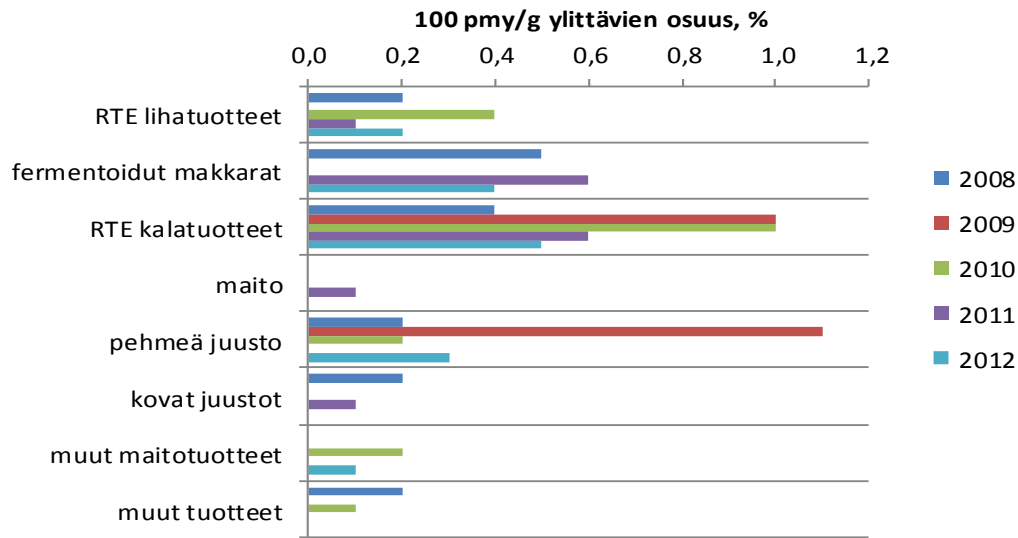
Listerioosin esiintyvyys Suomessa on Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen (*European Food Safety Authority*, EFSA) raporttien (2004–2012) mukaan suhteellisesti suurempi kuin keskimäärin muualla Euroopan Unionissa (EU). EU:n keskimääräinen listerioosin esiintyvyys oli 0,3–0,41 vahvistettua tapausta/100 000 asukasta, kun taas Suomessa vastaava luku oli 0,7–1,33. Kaikkina tutkittuina vuosina Suomi on ollut neljän eniten varmistettuja listerioositapauksia ilmoittaneen maan joukossa. Myös muissa pohjoismaissa Islantia lukuun ottamatta listerioosia esiintyy enemmän kuin keskimäärin Euroopassa. Raporttien mukaan suurin osa tautitapauksista on saatu kotimaasta (koottu lähteistä: Anon., 2014b; Anon., 2013b; Anon., 2012; Anon., 2011a; Anon., 2010; Anon., 2009b; Anon., 2008b; Anon., 2006; Anon., 2005).

Listerioosi on monia muita elintarvikevälitteisiä sairauksia vaarallisempi. Euroopassa listerioosilla oli vuonna 2013 kaikista tutkituista elintarvikevälitteisistä taudeista korkein sairaalaan joutumisaste (*hospitalization rate*, 99 %, muilla taudeilla noin 50–60 %) sekä kuolleisuus (15,6 %, muilla alle 1 %). Listerioosi aiheutti enemmän kuolemia kuin mikään muu elintarvikevälitteinen tauti, vaikka tapauksia oli paljon

vähemmän (1 763, vertailun vuoksi: kampylobakteeri aiheutti 214 779 ja salmonella-bakteerit 82 694 tapausta) (Anon., 2015). Myös Suomessa listerioosi oli samana vuonna harvinaisempi kuin esimerkiksi kampylobakteerin tai noroviruksen aiheuttamat infektiot (Jaakola *et al.*, 2014).

Listerioositilastojen pitäisi olla toisiinsa vertailukelpoisia vuodesta 2004, sillä EU-maiden tulisi ilmoittaa tautitapauksista EFSA:lle direktiivin 2003/99/EC mukaan. Yhtenäinen tautiluokitus on määritetty komission päätöksessä 2008/426/EC. Maiden välillä voi kuitenkin olla eroja esimerkiksi aliraportoinnin suhteen. Koko EU:n alueelta aliraportoinnista ei ole tehty arvioita, mutta yksittäisistä maista niitä on olemassa. Esimerkiksi Antal *et al.* (2007) huomasivat vertaillessaan Norjan ja Tanskan listerioositilastoja keskenään, että vaikka Norjassa kuolleisuus listerioosiin on huomattavasti korkeampi kuin Tanskassa, Norjassa on kuitenkin vähemmän ilmoitettuja listerioositapauksia. Väestötasolla kuolleisuudet ovat yhtä suuret (tapauksia/miljoona ihmistä), jolloin Tanskassa on tilastollisesti paljon enemmän epäfataaleja listerioositapauksia kuin Norjassa. Erojen voidaan päätellä johtuvan lievien tapausten aliraportoinnissa Norjassa (Antal *et al.*, 2007).

Elintarvikkeissa EU-tasolla yleisimmin *L. monocytogenes* -bakteeria löytyy yli 100 pmy/g pitoisuudella kalatuotteista, lihatuotteista ja pehmeistä juustoista. Tarkat luvut vuosittain on esitetty kuvassa 4. EU-tasolla eniten *L. monocytogenes* -bakteeria löytyy siis samoista tuotteista, jotka Suomessakin on ilmoitettu riskituotteiksi (Anon., 2013a).



Kuva 4. EU:ssa vuosien 2008–2012 aikana 100 pmy/g *L. monocytogenes* -pitoisuuden ylittäneiden näytteiden osuus kaikista näytteistä. Tutkitut näytteet olivat yksittäisiä näytteitä vähittäismyynnistä. Pitoisuudet eri vuosina eivät ole suoraan verrattavissa keskenään, sillä eri jäsenmaat ovat eri vuosina ilmoittaneet tuloksia. (koottu lähteistä: Anon., 2014b; Anon., 2013b; Anon., 2012; Anon., 2011a; Anon., 2010; Anon., 2009b)

Tämän diplomityön kokeellisessa osiossa tutkituista tuotteista EFSA:n raporteissa oli tarkempia tilastoja Suomen osalta ainoastaan kalatuotteissa. Tietoja löytyi vuosilta 2009 (Anon, 2010), 2008 (Anon., 2009b) ja 2004 (Anon., 2005). Näiden perusteella Suomessa esiintyy enemmän *L. monocytogenes* -bakteeria kalatuotteissa kuin keskimäärin EU:ssa. Tutkitut näytemäärät ja positiivisten näytteiden osuudet Suomessa ja EU:ssa yhteensä on esitetty taulukossa 2. Vuonna 2004 etenkin suomalaisissa kylmäsavustetuissa kalatuotteissa esiintyi enemmän *L. monocytogenes* -bakteeria, sekä positiivisten että 100 pmy/g ylittäneiden osalta. Graavatussa kalassa 100 pmy/g ylityksiä oli kuitenkin hieman EU:n keskitasoa vähemmän. Vuonna 2008 suomalaisten kalatuotteiden positiivisten näytteiden määrä oli kasvanut, kun taas EU:ssa yleisesti oli tapahtunut vähentymistä. Graavikalassa oli edelleen EU:n keskitasoa enemmän 100 pmy/g ylityksiä. Vuonna 2009 suomalaisissa tuotteissa

positiivisia näytteitä oli edelleen EU:n keskitasoa enemmän, mutta 100 pmy/g ylityksiä ei enää ollut. Luvut eivät kuitenkaan ole välttämättä täysin vertailukelpoisia. Kaikissa tuotteissa ei ollut täsmennetty, onko kyseessä kylmä- vai lämminsavustettu kalavalmiste. Suomen kohdalta tilastoja saattaa siis vääristää se, että kaikki tutkitut näytteet olivat joko kylmäsavustettuja tai graavattuja. Jos muiden maiden näytteet ovat olleet pääasiassa lämminsavustettuja tuotteita, Suomen osuus näyttää silloin suhteettoman isolta, sillä lämminsavustus tappaa listeriabakteerit tuotteista. On myös huomioitava, että tilastot sisälsivät muiden maiden osalta myös prosessoinnista kerättyjä näytteitä, kun Suomen kaikki näytteet oli kerätty vähittäismyynnistä. EU:n keskitasot eivät myös ole välttämättä vertailukelpoisia toisiinsa nähden, sillä eri maat ovat eri vuosina ilmoittaneet tuloksia.

Taulukko 2. EU:ssa ja Suomessa tutkitut kalanäytteet ja niiden *L. monocytogenes* -pitoisuus (koottu lähteistä Anon., 2010; Anon., 2009b; Anon., 2005).

| Vuosi | Tutkittuja kvalitatiivisia näytteitä | Positiivisten osuus, % | Tutkittuja kvantitatiivisia näytteitä | 100 pmy/g ylittävien osuus, % |
|---------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------|
| 2004 | | | | |
| EU | 1251 | 11,0 | 1251 | 3,0 |
| suomalainen, graavattu | 285 | 14,4 | 285 | 1,7 |
| suomalainen, kylmäsavustettu | 279 | 17,2 | 279 | 3,2 |
| 2008 | | | | |
| EU | 7126 | 9,8 | 7178 | 0,5 |
| suomalainen, graavattu | 192 | 33,9 | 192 | 3,1 |
| suomalainen, kylmäsavustettu | 149 | 33,6 | 149 | 0,7 |
| 2009 | | | | |
| EU | 2066 | 7,0 | 1965 | 0,6 |
| suomalainen, graavattu | 64 | 28,1 | 64 | 0 |
| suomalainen, kylmäsavustettu | 49 | 18,4 | 49 | 0 |

3.4 *L. monocytogenes* -bakteeriin liittyvä lainsäädäntö

EU:n lainsäädännössä on määritelty hyväksyttävät elintarvikkeiden pitoisuusrajat mikrobeille. Komission asetuksessa (EC) No 2073/2005 määritellään, että turvallinen elintarvikkeen *L. monocytogenes* -pitoisuustaso terveelle henkilölle on alle 100 pmy/g. Turvalliset pitoisuusrajat RTE-elintarvikkeille on määritelty seuraavasti: RTE-elintarvikkeet, jotka pystyvät muodostamaan kasvualustan *L. monocytogenes* -bakteerille eivät saa sisältää lainkaan *L. monocytogenes* -bakteeria ennen kuin elintarvike on lähtenyt sen tuottaneen valmistajan välittömästä valvonnasta eikä se saa ylittää 100 pmy/g myyntiaikana. Jos taas RTE-elintarvike ei pysty toimimaan

kasvualustana *L. monocytogenes* -bakteerille, saa pitoisuus jo valmistajalta lähtiessä olla alle sallitun raja-arvon, kunhan valmistaja pystyy takaamaan, ettei se ylitä tuotteen myyntiaikana.

KOKEELLINEN OSIO

4 Kokeellisen osion tavoitteet

Kokeellisen osion tavoitteena oli koota ja analysoida tietoa uuteen BIKE-projektin (Makera-tukihanke 1884/31272013) saanninarviointimalliin sekä määrittää kvalitatiivinen arvio *L. monocytogenes* -altistuksesta keskimääräiselle suomalaiselle tutkituista elintarvikeryhmistä. Työ suoritettiin järjestelemällä ja käsittelemällä tilastollisin menetelmin erilaisia pitoisuusaineistoja sekä tilastotietoa. Simulointia hyödyntämällä pystyttiin arvioimaan, millaisia pitoisuuksia alle määritysrajan jääneet näytteet saattaisivat sisältää sekä ennustamaan, miten *L. monocytogenes* -bakteerit pystyvät kasvamaan tutkituissa elintarvikeryhmissä.

Kokeellisen osion aluksi esitellään tätä diplomityötä varten käyttöön saadut aineistot. Tämän jälkeen kerrotaan tutkimukseen käytetyt menetelmät. Tuloksia esitellään ensin kvalitatiivisesti erilaisille elintarvikeryhmille. Tämän jälkeen siirrytään tarkemmin kertomaan tuloksia graavisuolatuille ja kylmäsavustetuille kalatuotteille, tyhjiö- tai vakuumpakatuille siivutetuille lihatuotteille sekä raakamaidolle ja homejuustoille. sekä simuloituille pitoisuustiedoille. Viimeisenä esitetään kvalitatiivinen altistuksen arvio tutkituissa elintarvikeryhmissä. Kokeellisen osion päätteeksi esitetään työn yhteenveto.

5 Materiaali ja perusaineisto

Tässä diplomityössä tarkastellaan kahdenlaisia aineistoja: tilastotietoa elintarvikkeiden kulutuksesta sekä elintarvikkeista määritettyjä *L. monocytogenes* -pitoisuustietoja.

5.1 Graavisuolattujen ja kylmäsavustettujen kalatuotteiden ja raakamaidon tuotanto ja kulutus Suomessa

Suomessa valmistettiin vuosina 2007–2013 keskimäärin 2037 t/a graavisuolattuja kalavalmisteita ja 1971 t/a kylmäsavustettuja kalavalmisteita. Yleisimmät käytetyt kalalajit olivat kirjolohi (keskimäärin 47 % graavisuolatuista ja 83 % kylmäsavustetuista tuotteista) ja lohi (17 % ja 16 %). Kaikista kalatuotteista noin 25 % ja kaikesta kalasta noin 5 % oli graavisuolattua tai kylmäsavustettua. (Anon., 2014c). Tuonti- ja vientikalatuotteiden osalta tullin tilastossa ei ole eroteltu raakana ja kypsänä syötäviä kalatuotteita erikseen. Kaikkia kalatuotteita (suolattu, savustettu tai kuivattu) oli kuitenkin tuotu vuosien 2007–2013 aikana keskimäärin 16172 t/a ja viety 199 t/a. Näistä 25 % oli 403 t/a ja 50 t/a, vastaavassa järjestyksessä. (Anon, 2014d). Näiden lukujen perusteella keskimääräinen suomalainen oli syönyt yhteensä noin 800 g graavisuolattuja ja kylmäsavustettuja kalatuotteita vuodessa. Oletuksena oli, että 0–2-vuotiaat eivät kuluta kyseisiä tuotteita. Väestön määrä (2007–2013 keskiarvo) on saatu tilastokeskukselta (Anon., 2014e).

Raakamaidon kulutus on maataloustilaston mukaan vuosina 1990–2013 ollut keskimäärin 5,2 kg/a henkeä kohti (vertailun vuoksi: pastöroitua rasvatonta maitoa, kevyt- ja täysmaitoa on kulutettu keskimäärin yhteensä 134 kg/a/henkilö) (Anon, 2014f). Raakamaidon kulutus ei kuitenkaan ole jakautunut tasaisesti, vaan kulutus oli Perkiömäki *et al.* (2012) tutkimuksen mukaan suurempaa vakiintuneiden käyttäjien keskuudessa. Näiden joukkoon kuului myös riskiryhmien edustajia (Perkiömäki *et al.*, 2012). Lihatuotteiden käytön osalta tilastoja ei ole saatavilla, sillä sekä tullin tilastoissa että maataloustilastoissa tuotteita ei ole eritelty toisistaan riittävästi.

5.2 Elintarvikkeiden *L. monocytogenes* -pitoisuusaineistot

Tätä diplomityötä varten saatiin käyttöön vuosien 2004–2013 aikana kerättyjä elintarvikkeiden *L. monocytogenes* -pitoisuusaineistoja. Aineistoon kuuluivat

kansallisten listeriakartoitusten tulokset vuosilta 2004, 2008–2009, 2011 ja 2012–2013 sekä EU-tasolla tehty listeriakartoitus vuodelta 2010. Nämä tutkimukset sisälsivät tietoja RTE kala-, liha- ja maitotuotteista. Lisäksi elintarvikeryhmiä vertailtiin toisiinsa Eviran Patogenix-tiedonhallintajärjestelmän *L. monocytogenes* -tuloksista.

5.2.1 Kansallinen listeria 2004

Elintarvikevirasto, Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitos tutkivat yhdessä Kokkolan ja Mikkelin kuntien sekä Porvoon ja Vantaan kaupunkien valvontaviranomaisten kanssa graavi- ja kylmäsavukaloista sekä märeistä *L. monocytogenes* -bakteerin esiintymistä. Tulokset on aikaisemmin julkaistu EVI-EELA julkaisussa 1/2006 (Johansson & Nuppunen, 2006). Aineisto koostui 596 näytteestä joista 567 oli kalanäytteitä ja 29 mätinäytteitä. Tässä diplomityössä käsitellään ainoastaan kalanäytteitä. Eri valmistajia oli yhteensä 51, joista kalanäytteiden valmistajia oli 46 ja mätinäytteiden valmistajia 11. Valmistajien joukossa oli kalalaitoksia, myymälöitä ja yksityisiä kalastajia. Kalanäytteiden määrät ja *L. monocytogenes* -positiivisten näytteiden osuus on esitetty taulukossa 3.

Kalanäytteet oli kerätty vähittäismyynnistä. Samasta valmistuserästä oli valittu kaksi rinnakkaisnäytettä. Näytteiden lämpötila oli mitattu kaupassa. Pakatut näytteet oli tutkittu viimeisenä käyttöpäivänä tai mahdollisimman lähellä ennen sitä, jos päivämäärä oli osunut viikonlopulle. Palvelutiskistä saadut tuotteet oli tutkittu heti. Näytteitä oli säilytetty ennen tutkimusta laboratoriossa 7 ± 1 °C:ssa. Tutkimukset oli suoritettu ISO 11290-1 (1996) ja ISO 11290-2 (1998) -standardien mukaan. Valikoivana alustana oli käytetty veriagaria. Kvalitatiivisesti positiivista todetuista näytteistä oli tehty kvantitatiivinen *L. monocytogenes* -määritys (Johansson & Nuppunen, 2006).

Taulukko 3. Vuoden 2004 listeriakartoituksen kalanäytteiden näytemäärät ja positiivisten sekä *L. monocytogenes* -pitoisuuden 100 pmy/g ylittävien näytteiden osuus.

| | Näytemäärä | Osuus näytteistä, % | Positiivisten osuus, % | 100 pmy/g ylittävien osuus, % |
|----------------------------------|------------|------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Kaikki näytteet | 567 | 100 | 15,7 | 2,3 |
| Tuote | | | | |
| Graavi | 285 | 50,3 | 14,4 | 1,4 |
| Kylmäsavu | 279 | 49,2 | 17,2 | 3,2 |
| Kalalaji | | | | |
| Kirjolohi | 418 | 73,7 | 17,7 | 2,6 |
| Lohi | 127 | 22,4 | 10,2 | 1,6 |
| Siika | 22 | 3,9 | 9,1 | 0 |
| Pakkaustyyppi | | | | |
| Pakattu | 430 | 75,8 | 16,3 | 2,3 |
| Palvelutiski | 135 | 23,8 | 12,6 | 0,7 |
| Suojakaasu tai vakuumipakkaus | 211 | 37,2 | 15,2 | 1,4 |
| Käsittelyt | | | | |
| Viipaloitu | 251 | 44,3 | 14,0 | 2,8 |
| Pala | 242 | 42,7 | 14,0 | 2,1 |

5.2.2 Kansallinen listeria 2008–2009

Vuoden 2008 kartoituksessa oli tutkittu kylmäsavustettuja ja graavisuolattuja vakuumipakattuja kalatuotteita. Näytteiden keräyksen oli suorittanut Evira. Tuloksia ei ole aikaisemmin julkaistu lukuun ottamatta lyhyttä selostusta Eviran internetsivuilla (Anon., 2013a) sekä Zoonosikeskuksen raportissa (Raulo *et al.*, 2012).

Näytteitä oli tutkittu yhteensä 453. Eri valmistajia oli yhteensä 11. Tarkemmat luvut tutkittujen näytteiden määrästä ja positiivisten näytteiden osuudesta on esitetty taulukossa 4. Jokaisesta tutkitusta erästä oli pyritty ottamaan yksi näyte. Näytteenoton yhteydessä oli mitattu lämpötila. Näytteitä oli säilytetty laboratoriossa korkeintaan 4 °C:ssa ennen tutkimusta ja ne oli tutkittu viisi päivää ennen viimeistä käyttöpäivää. Positiiviseksi todetuista näytteistä oli tutkittu kvantitatiivinen pitoisuus.

Taulukko 4. Vuosien 2008–2009 listeriakartoituksen näytemäärät ja positiivisten sekä *L. monocytogenes* -pitoisuuden 100 pmy/g ylittävien näytteiden osuus.

| | Näytemäärä | Osuus näytteistä, % | Positiivisten osuus, % | 100 pmy/g ylittävien osuus, % |
|-----------------------------|------------|------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Kaikki näytteet | 453 | 100 | 31,8 | 1,8 |
| Tuote | | | | |
| Graavi | 255 | 56,3 | 33,3 | 2,7 |
| Kylmäsavu | 197 | 43,5 | 29,9 | 0,5 |
| Kalalaji | | | | |
| Kirjolohi | 304 | 67,1 | 34,5 | 1,0 |
| Lohi | 120 | 26,5 | 29,2 | 4,2 |
| Siika | 29 | 6,4 | 13,8 | 0,0 |
| Alkuperämaa | | | | |
| Suomi | 92 | 20,3 | 17,4 | 0 |
| Pohjoismaa | 111 | 24,5 | 33,3 | 1,8 |
| Ulkomainen tai ei tietoa | 250 | 55,2 | 36,4 | 2,4 |
| Käsittelyt | | | | |
| Viipaloitu | 412 | 90,9 | 31,6 | 6,2 |
| Pala | 41 | 9,1 | 34,1 | 0 |

5.2.3 EU:n *L. monocytogenes* -kartoitus tietyistä RTE-ruoista vuodelta 2010

EU:ssa toteutettiin komission päätöksellä (2010/678/EU) vuosien 2010–2011 aikana koko jäsenmaiden laajuinen *L. monocytogenes* -kartoitus. Kartoituksessa tutkittiin kolme eri elintarvikeryhmää: pakattu kylmä- tai lämminsavustettu tai graavattu kala, pehmeä tai puolipehmeä juusto pois lukien tuorejuusto ja pakattu lämpökäsitelty lihatuote. Näytteiden keruu ja analysointi hoidettiin kansallisella tasolla. Suomessa tästä vastasi Evira. Näytteet kerättiin kahdeksan isoimman kaupungin vähittäismyynnistä. Näytteitä oli tutkittu Suomessa juustoryhmässä 65, liharyhmässä 66 ja kalaryhmässä 63. Näytteen keruun yhteydessä oli mitattu lämpötila. Analysointi oli suoritettu ISO 17025 -akkreditoidussa laboratoriossa. *L. monocytogenes* -bakteerin

esiintyminen oli testattu kaikista näytteistä kvalitatiivisesti. Vain yhdestä positiivisesta kalanäytteestä oli määritetty kvantitatiivinen pitoisuus. Juustoista ja lihatuotteista ei ollut löytynyt yhtäkään *L. monocytogenes* -positiivista näytettä. Kalanäytteet on esitetty tarkemmin taulukossa 5. Kaikista näytteistä oli mitattu lisäksi pH ja veden aktiivisuus. Loppuraportteja ei ole julkisesti saatavilla.

Taulukko 5. Vuoden 2010 kalanäytteiden listeriakartoituksen näytemäärät ja positiivisten sekä *L. monocytogenes* -pitoisuuden 100 pmy/g ylittävien näytteiden osuus.

| | Näytemäärä | Osuus näytteistä, % | Positiivisten osuus, % | 100 pmy/g ylittävien osuus, % |
|--------------------------------|------------|------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Kaikki näytteet | 63 | 100 | 15,9 | 1,6 |
| Tuote | | | | |
| Graavi | 18 | 28,6 | 22,2 | 0 |
| Kylmäsavu | 22 | 34,9 | 18,2 | 4,5 |
| Lämminsavu | 12 | 19,0 | 0 | 0 |
| Kalalaji | | | | |
| Kirjolohi | 38 | 60,3 | 18,4 | 2,6 |
| Lohi | 17 | 27,0 | 5,9 | 0 |
| Siika | 4 | 6,3 | 25,0 | 0 |
| Pakkaustyyppi | | | | |
| Suojakaasu | 17 | 27,0 | 23,5 | 5,9 |
| Vakuumi | 46 | 73,0 | 13,0 | 0 |
| Alkuperämaa | | | | |
| Suomi | 44 | 69,8 | 11,4 | 2,3 |
| Ulkomainen | 19 | 30,2 | 26,3 | 0 |
| Käsittelyt | | | | |
| Viipaloitu | 47 | 74,6 | 19,1 | 2,1 |
| Säilyvyystekijät | | | | |
| pH alle 6 | 11 | 17,5 | 27,3 | 0 |
| pH 6 tai yli | 52 | 82,5 | 13,5 | 1,9 |
| a _w 0,9 tai alle | 24 | 38,1 | 4,2 | 0 |
| a _w yli 0,9 | 39 | 61,9 | 23,1 | 2,6 |
| ei säilöntäaineita | 37 | 58,7 | 2,7 | 0 |
| sis. jotain säilöntäainetta | 26 | 41,3 | 34,6 | 3,8 |

5.2.4 *L. monocytogenes* raakamaidossa 2011

Evira tutki kesän 2011 aikana 183 raakamaitonäytettä, joista tutkittiin 7 eri patogeeniä sekä bakteerien kokonaismäärä. Näytteenoton oli hoitanut meijerit. Tätä diplomityötä varten saatiin käyttöön kvalitatiiviset *L. monocytogenes* -bakteeria koskevat tutkimustulokset. Kyseisen bakteerin määrittäminen raakamaidosta oli suoritettu

muunnellun ISO 11290-1:1996 - standardin mukaisesti. Tulokset ovat aikaisemmin julkaisseet Ruusunen *et al.* (2013).

5.2.5 Lihavalmisteiden listeriaprojekti (EVO) 2012–2014

Vuosien 2012–2014 listeriaprojektissa oli tutkittu sellaisenaan syötäviä, siivutettuja, tyhjiö- tai suojakaasupakattuja lihavalmisteita yhteensä 57 eri valmistajalta tai pakkaajalta. Kestomakkarat, maksamakkarat ja pateet oli kuitenkin jätetty tutkimuksen ulkopuolelle. Kuntien viranomaiset tutkituttivat näytteitä Eviran suunnitelman mukaisesti ja raportoivat tulokset Eviraan. Näytteet oli kerätty vähittäismyynnistä ja samalla näytteiden lämpötila oli mitattu. Projektista on kerrottu Eviran internetsivuilla (Anon., 2014g). Näytemäärät ja positiivisten näytteiden osuudet on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. Vuosien 2012–2014 lihavalmistajien listeriaprojektissa tutkittujen näytteiden määrät, positiivisten osuus ja 100 pmy/g ylittävien näytteiden osuus.

| | Näytemäärä | Osuus näytteistä, % | Positiivisten osuus, % | 100 pmy/g ylittävien osuus, % |
|-------------------------------|------------|------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Kaikki näytteet | 793 | 100 | 1,3 | 0 |
| Käsittelyt | | | | |
| Kylmäsavustettu | 52 | 6,6 | 1,9 | 0 |
| Eläinlaji | | | | |
| Nauta | 75 | 9,5 | 0 | 0 |
| Sika | 492 | 62,0 | 1,2 | 0 |
| Siipikarja | 159 | 20,1 | 1,3 | 0 |
| Poro | 13 | 1,6 | 7,7 | 0 |
| Hevonen | 8 | 1,0 | 0 | 0 |
| Muu, sekoitus tai ei tiedossa | 46 | 5,8 | 2,2 | 0 |
| Alkuperämaa | | | | |
| Suomi | 376 | 47,4 | 0,5 | 0 |
| Ulkomainen | 84 | 10,6 | 6,0 | 0 |
| Ei tiedossa | 333 | 42,0 | 0,9 | 0 |
| Pakkaustyyppi | | | | |
| Suojakaasu | 652 | 82,2 | 0,9 | 0 |
| Vakuumi | 126 | 15,9 | 3,2 | 0 |

5.2.6 Patogenix-tiedonhallintajärjestelmä

Patogenix on Eviran ylläpitämä tiedonhallintajärjestelmä, johon laboratoriot rekisteröivät elintarvikkeiden mikrobietuloksia. Tässä diplomityössä käytettiin listeria-tuloksia, joita oli vuosilta 2007–2014. Tiedonhallintajärjestelmään ei ole yleistä pääsyä. Elintarvikkeet on jaoteltu seuraaviin ryhmiin:

- eräät ravintorasvat ja -öljyt
- hedelmät ja vihannekset ja niistä tehdyt valmisteet
- jäätelöt ja jälkiruoat
- kaakao ja kaakaovalmisteet, kahvi ja tee

- kala ja kalavalmisteet
- keitot, liemet ja kastikkeet
- liha ja lihavalmisteet, riista, siipikarja
- maito- ja maitovalmisteet
- makeiset, hunaja ja sokeri
- mehut, juomat, kivennäisvesi, pakattu vesi
- muna ja munavalmisteet
- pähkinät ja pähkinä tuotteet ja naksut
- valmisruuat
- vilja- ja leipomovalmisteet
- yrtit ja mausteet.

Nämä on vielä jaoteltu alakategorioihin. Lisäksi näytteistä on saatavilla tiedot tutkimusvuodesta, näytteenotto paikasta, tuotteen alkuperästä, tutkimuksen suorittaneesta laboratoriosta ja näytteenoton perusteesta (viranomaisnäyte/omavalvonta).

6 Tutkimusmenetelmät ja tutkimuksen suoritus

Kala- ja lihatuotetutkimustuloksista tarkasteltiin tilastollisin keinoin erilaisia prevalenssia nostavia tekijöitä sekä laskettiin tilastollisia tunnuslukuja. Määritysrajan alapuolelle jäävien pitoisuuksien vuoksi pitoisuuksille mallinnettiin jakauma Bayesiläistä tilastomatematiikkaa hyödyntäen. Kala- ja lihatuotteiden pitoisuustietoja simuloitiin kahdella eri ennustavalla mallilla, jotta saataisiin tietoa pitoisuuksista, joita elintarvikkeiden *L. monocytogenes* -konsentraatiot voivat enimmillään saavuttaa.

6.1 Tilastolliset menetelmät

Tilastojen analysointiin käytettiin IBM SPSS Statistics 22 -ohjelmaa. Kvalitatiivisiin tuloksiin käytettiin ristiintaulukointia ja χ^2 -testiä. Positiivisten näytteiden osuuksien luottamusvälit laskettiin asettamalla positiivisten tulosten arvoksi 1 ja negatiivisten 0. Luottamusväli laskettiin näiden keskiarvosta. Lineaarista riippuvuutta testattiin laskemalla Pearsonin korrelaatiokerroin, r (*bivariate correlation*), tai lineaarisella regressioanalyysillä. Merkitsevyystasoksi valittiin kaikissa testeissä 5 %.

6.2 Määrittämissuorituksen alapuolelle jäävien pitoisuuksien käsittely

Pitoisuuksien simuloinnissa hyödynnettiin OpenBUGS- ohjelmaa, jossa käytetään Markovin ketju Monte Carlo -tekniikkaa bayesiläiseen tilastoanalyysiin. Pitoisuusjakaumat mallinnettiin sekä log-normaalia (2) että gamma-jakaumaa (3) käyttäen. Log-normaalien mallin parametri μ saatiin log-normaalista jakaumasta parametrien arvoilla $\mu=0$ ja $\tau=0,01$ ja parametri τ gamma-jakaumasta parametrien arvoilla $r=0,01$ ja $\mu=0,01$. Gamma-mallin molemmat parametrit saatiin eksponentiaalista mallista ($\lambda e^{-\lambda x}$, $x>0$) parametrin λ arvolla 0,01. Pitoisuuden alarajaksi asetettiin 1 pmy/25 g (näytteitä punnittu määrityksiin 25 g). Alle määrittämissuorituksen alapuolelle näytteille asetettiin ylärajaksi määrittämissuoritus. Iterointia suoritettiin 10 000 kierrosta.

Eri malleja vertailtiin toisiinsa ohjelman laskeman *deviance information criterion* (DIC) -arvon perusteella. DIC-arvoa käytetään bayesiläisten mallien vertailuun. Se on kahden osan summa siitä, miten hyvin malli istuu dataan ja miten monimutkainen malli on (Spiegelhalter *et al.*, 2002).

$$\sqrt{\frac{\tau}{2\pi}} \frac{1}{x} e^{-\frac{\tau}{2}(\lg x - \mu)^2}, x > 0 \quad (2)$$

$$\frac{\mu^r x^{r-1} e^{-\mu x}}{\Gamma(r)}, x > 0 \quad (3)$$

Missä

x=pitoisuus (log₁₀(pmy/g) log-normaalissa jakaumassa ja pmy/g gamma-jakaumassa)

τ, μ ja r=mallien parametreja

6.3 Mikrobien kasvun mallintaminen

Mikrobien kasvua ennustettiin tutkimuspäivänä löydetystä pitoisuudesta viimeiseen käyttöpäivään asti. Tähän tarkoitukseen käytettiin kahta eri mallia: Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP) ja Combase -malleja. Aineistona käytettiin vuosien 2004, 2008–2009 ja 2012–2013 tutkimuksia.

6.3.1 Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)

FSSP on Tanskan teknillisen korkeakoulun (Technical University of Denmark) ja sen alaisen tutkimuslaitoksen (National Food Institute) kehittämä mikrobien kasvun ennustukseen tarkoitettu ohjelma. Tässä työssä käytettiin *L. monocytogenes* -bakteerin kasvun ennustamiseen tarkoitettua mallia (Growth of *L. monocytogenes*). *L. monocytogenes* -bakteerin kasvun ennustus perustuu logistiseen malliin, jonka on kehittänyt Mejholm ja Dalgaard (2015). Malli ottaa huomioon 12 erilaista ympäristöön liittyvää parametria. Nämä ovat lämpötila, ilmakehä, vesifaasin suolapitoisuus eli veden aktiivisuus, pH, savuyhdisteiden/fenoliyhdisteiden määrä, nitriitin määrä ja kuuden eri orgaanisen hapon pitoisuus. Mallin lämpötila-alue on 2–25 °C ja pH-alue 5,6–7,7. Mallin saa ajettua joko lag-ajalla tai ilman. Pohjana ovat elintarvikkeilla tehdyt kokeet (Anon, 2014h).

6.3.2 Combase

Combase on internetissä toimiva malli mikrobien kasvun ennustamiseen. Sen on kehittänyt ja ylläpitää Britannian kansallinen elintarviketutkimuslaitos (Institute of Food Research), Yhdysvaltojen maatalousministeriö (United States Department of Agriculture) ja Tasmanian yliopiston elintarviketurvallisuuskeskus (University of Tasmania Food Safety Center) (Anon., 2013c). Kineettinen malli pohjautuu Baranyin ja Roberts (1994) kehittämään empiristiseen malliin. Mallissa solun fysiologista tilaa kuvataan yhdellä muuttujalla, joka samalla kertoo solun lag-ajan. Combasen ennustava malli perustuu laboratoriossa elatusaineilla tehtyihin kokeisiin. Malliin pystytään syöttämään seuraavat ympäristömuuttujat: lämpötila, pH ja suolakonsentraatio, sekä tässä diplomityössä käytettyyn *Listeria monocytogenes/innocua* with CO₂ (%) -malliin myös hiilidioksidipitoisuus. Lämpötila-alue on 2–37 °C ja pH-alue 4,6–7,5. Soluille pystyi määrän lisäksi antamaan arvon 0–1 fysiologiselle tilalle (Anon., 2013c).

6.3.3 Mallintamisen suoritus pitoisuustiedoista

Aineistosta valittiin näytteet, jotka sisälsivät vähintään seuraavat tiedot: kvantitatiivinen *L. monocytogenes* -pitoisuus tai -pitoisuusluokka, aikaväli analyysin suorittamisesta viimeiseen käyttöpäivään sekä näytteenottoaikassa mitattu lämpötila. Jos pitoisuus oli alle mittausrajan, tutkittiin pitoisuudet kolmessa osassa: mittausrajan alarajalla, puolivälissä ja ylärajalla (määritysraja 10 pmy/g, jolloin mallinnetut pitoisuudet 1, 5 tai 9 pmy/g). Combasen alin mahdollinen pitoisuus on 1 pmy/g, joten mallinnus alarajalla suoritettiin tällä arvolla. Ennusteet tehtiin kaupassa näytteelle mitatulla lämpötilalla viimeiseen käyttöpäivään asti. Jos analyysi oli tehty viimeisenä käyttöpäivänä, tuloksia käytettiin sellaisenaan ilman ennustamista. Tällöin mallinnettu pitoisuus kuvaa sitä tilannetta, että tuote ostetaan viimeisenä käyttöpäivänä ja kulutetaan ilman säilytystä eli saadaan kaikkien näytteiden suurin

mahdollinen pitoisuusarvo, sillä oletuksella, että elävien solujen määrä lisääntyy säilytyksen aikana.

Parametreissa pyrittiin käyttämään mahdollisuuksien mukaan mitattua tietoa. Jos mittaustietoa ei ollut saatavilla, käytettiin parametrien arvoina ohjelman tai tietokannan oletusarvoja tai kirjallisuudesta löytyviä arvoja, niin että ne vastaisivat mahdollisimman todenmukaisesti todellisia arvoja. pH:ksi valittiin kalatuotteille 6,0 (Guyer & Jemmi, 1991), pekonille 5,5 (Drosinos & Paramithiotis, 2009) ja lihatuotteille arvo 6,3 (Glass & Doyle, 1989). Kalanäytteiden suolapitoisuus laskettiin keskiarvona neljästä Terveysten- ja hyvinvoinnin laitoksen fineli-tietokannasta löydetyn kalatuotteen suolapitoisuudesta (Anon., 2013d-2013g). Pekonille käytettiin suolapitoisuudessa arvoa 2,5 % (Anon., 2013h) ja muille lihatuotteille valmistajien ilmoittamia arvoja, jotka oli etsitty aineiston perusteella valmistajan ilmoittamista tuotetiedoista. Suojakaasupakkauksen hiilidioksidipitoisuudeksi oletettiin 30 % (Phillips, 1996). Muilla pakkauksilla, myös pakkaamattomilla oletettiin hiilidioksidipitoisuus nolaksi. Tämä on perusteltua, sillä ilmakehän hiilidioksidipitoisuus on hyvin pieni. Koska ei ole selvää, miten pitkä lag-aika *L. monocytogenes* -bakteerilla on elintarvikkeissa (Anon., 2014i), pitoisuudet ennustettiin FFSP:llä sekä ilman lag-aikaa että sen kanssa. Combasessa käytettiin mallin kehittäjän suosituksen mukaan fysiologiselle tilalle oletusarvoa (Anon., 2013c). Käytetyt parametrien arvot on esitetty taulukossa 7. Osalle näytteistä mitattu lämpötila oli alhaisempi kuin mallien alarajat. Tällöin mallintamisessa käytettiin alarajaa.

Taulukko 7. Käytetyt parametrien arvot molemmissa käytetyissä malleissa. Suolapitoisuudet vastaavat toisiaan, kun tuotteen kuivapaino-osuus on 30 %. Taulukkoon on merkitty -, kun kyseinen parametri ei sisälly malliin.

| Parametri | Arvo FSSP | Combase |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| NaCl-pitoisuus, % | - | 3,4 (kalatuotteet); 2,5 (pekoni) tai 1,9 (broilerleikkele) |
| NaCl-pitoisuus vesifaasissa, % | 4,63 (kalatuotteet); 3,45 (pekoni) tai 2,64 (lihatuotteet) | - |
| pH | 6,0 (kalatuotteet); 5,6 (pekoni) tai 6,3 (lihatuotteet) | 6,0 (kalatuotteet); 5,5 (pekoni) tai 6,3 (lihatuotteet) |
| CO ₂ -pitoisuus, % | 0 (vakuumi tai ei eritelty) tai 30 (suojakaasupakattu) | 0 (vakuumi tai ei eritelty) tai 30 (suojakaasupakattu) |
| fenolipitoisuus, ppm | 10 (savustetut tuotteet) tai 0 (muut) | - |
| nitriittipitoisuus, ppm | 0 | - |
| orgaanisten happojen pitoisuus, ppm | 0 | - |
| fysiologinen tila | - | 0,020651 |

Simuloinnin avulla tarkasteltiin myös tilannetta, jossa kuluttaja säilyttää osan ajasta tuotetta jääkaapissaan. Tämän vaikutusta *L. monocytogenes* -pitoisuuteen kalatuotteessa testattiin erilaisten skenaarioiden avulla FSSP:llä. Kotijääkaappien lämpötilat saatiin EFSA:n tutkimuksesta kotijääkaappien lämpötiloista seitsemässä eri jäsenmaassa. Tutkimusten keskiarvot vaihtelivat välillä 5,0–7,2 °C. Kaikkien tutkimusten painotettu keskiarvo oli 6,5 °C. Tutkimuksissa pienin mitattu yksittäinen arvo oli -7,9 °C ja suurin 20,7 °C. Raportin mukaan kuitenkin valmistajilla noudatetaan melko hyvin ohjelämpötiloja (0–3 °C) (Anon, 2007b). Tämän vuoksi simulointi jaettiin ajanjaksoihin, joissa oli eri lämpötilat. Kokeillut ajanjaksot olivat kolme tai seitsemän

päivää 3 °C (aika valmistajalla, kuljetusketjussa ja vähittäismyynnissä) sekä aika kuluttajan jääkaapissa kolmessa eri lämpötilassa. Kotijääkaapin lämpötiloiksi oletettiin suosituksen mukainen 3 °C, keskimääräinen lämpötila 6,5 °C ja 10 °C. Kalojen oletettiin olevan näissä vakiolämpötiloissa viimeiseen käyttöpäivään asti Eviran suosituksen ylärajan mukaan eli 14 päivää (Anon., 2000) tai kolme viikkoa. *L. monocytogenes* -alkukonsentraatioksi valittiin 5 pmy/g tai 1 pmy/g. Simuloinnit suoritettiin muiden lähtöarvojen osalta taulukon 7 mukaan.

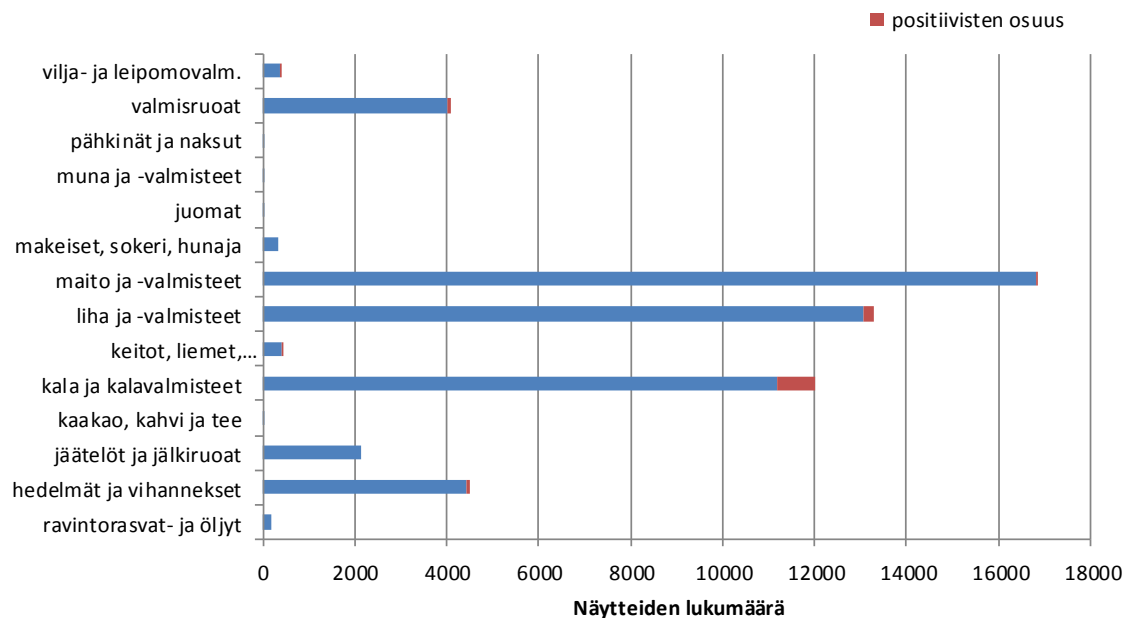
7 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Tässä kappaleessa tarkastellaan ensin eri elintarvikeryhmien *L. monocytogenes* -bakteerin esiintyvyyden eroja Patogenixiin tallennettujen tulosten perusteella. Tarkempia tuloksia esitetään erikseen kala- liha- ja maitotuotteista. Ennustetietoja esitetään kala- ja lihatuotteiden osalta.

7.1 *L. monocytogenes* -bakteerin esiintyminen elintarvikkeissa Patogenixin perusteella

Patogenixista käytiin läpi vuosien 2007–2014 kaikki järjestelmään tallennetut analyysitulokset. *L. monocytogenes* -positiivisia näytteitä löytyi seuraavista elintarvikeryhmistä: kala- ja kalavalmisteet (positiivisia näytteitä 6,8 %; 95 % luottamusväli 6,4–7,3 %); valmisruoat (2,2 %; 1,8–2,6 %); vilja- ja leipomovalmisteet (2,1 %; 0,6–3,5 %); hedelmät, vihannekset ja niistä tehdyt valmisteet (1,9 %; 1,5–2,3 %); liha ja lihavalmisteet, riista, siipikarja (1,6 %; 1,4–1,8 %); keitot, liemet ja kastikkeet (0,3 %; 0–0,7 %) sekä maito ja maitovalmisteet (0,2 %; 0,09–0,2 %). Muissa ryhmissä positiivisia ei ollut löytynyt. Näissä ryhmissä tosin myös tutkittuja näytteitä oli huomattavasti vähemmän kuin ryhmissä, joissa oli positiivisia *L. monocytogenes* -tuloksia. Kaikki tulokset on esitetty kuvassa 5. Eniten *L. monocytogenes* -bakteeria

esiintyi tämän aineiston perusteella ryhmässä kala ja kalavalmisteet. Ryhmän sisällä oli kuitenkin eroavaisuuksia. Eniten positiivisia tuloksia oli alaryhmissä tuore kala (12,3 %; 10,4–14,1 %), savustettu tai suolattu kalavalmiste (7,2 %; 6,6–7,9 %) sekä erittelemättömät tuotteet (5,8 %; 5,1–6,6 %). Sen sijaan kuumennetuissa kalatuotteissa sekä äyriäisissä ja simpukoissa positiivisten osuus oli pieni, 0,8 % (0,1–1,5 %) ja 0,9 % (0–2,1 %).

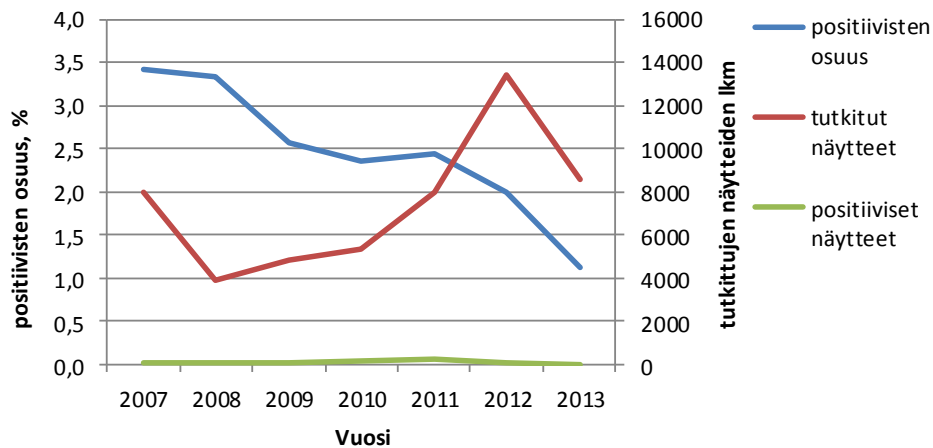


Kuva 5. Tutkitut elintarvikkeiden *L. monocytogenes* -näytteet elintarvikeryhmittäin vuosina 2007–2014 sekä positiivisten näytteiden osuus Patogenixin mukaan.

Myös muiden pääryhmien elintarvikkeissa oli eroja positiivisten näytteiden osalta. Riskinä pidetyissä RTE-lihatuotteissa positiivisten näytteiden osuus oli melko pieni (naudanlihavalmisteilla 1,6 %; 95 % luottamusväli 0,2–3,1 %, siipikarjanlihavalmisteilla 0 % ja sianlihavalmisteilla 0,8 %; 0,6–1,1 %). Sen sijaan tuoreella sianlihalla ja siitä tehdyillä valmisteilla, tuoreella broilerinlihalla ja siitä tehdyillä valmisteilla sekä sika-nautajauhelihaalla positiivisten osuus oli suuri: 7,2 % (3,4–10,9 %), 17,8 % (11,3–24,2 %) ja 38,5 % (12,0–64,9 %). Näillä tosin näytemäärät olivat melko pieniä, 181, 135 ja

13 tutkittua näytettä. Maidossa ja maitotuotteissa positiivisia näytteitä esiintyi runsaimmin käsittelemättömässä maidossa (8,2 %; 4,5–12,0 %). Muissa maidon alaryhmissä positiivisia oli alle 1 %. Muissa pääelintarvikeryhmissä positiiviset näytteet olivat jakautuneet suhteellisen tasaisesti alaryhmien välillä.

Tämän aineiston perusteella *L. monocytogenes* -pitoisten näytteiden esiintymisessä oli tilastollisesti merkitsevä laskeva trendi (kuva 6, $p=0,01$, lineaarinen regressio). Ainoastaan hedelmissä, vihanneksissa ja niistä tehdyissä valmisteissa sekä maidossa ja maitotuotteissa positiivisten näytteiden osuus lisääntyi hieman, mutta näissä ryhmissä oli ylipäänsä hyvin vähän positiivisia näytteitä (keskimäärin noin 1,5 % ja alle 1 %). Tutkitut näytemäärät ovat kokonaisuudessaan vaihdelleet hieman alle neljästä tuhannesta yli kolmeentoista tuhanteen 2007–2013 aikana (kuva 6). Tutkittujen näytteiden jakauma on ollut vuosittain samantapainen, tutkituimpien näyteryhmien joukossa on eniten kala-, liha- ja maitotuotteita.



Kuva 6. *L. monocytogenes* -positiivisten näytteiden osuus kaikissa elintarvikeryhmissä vuosina 2007–2013 ja tutkittujen näytteiden määrä kaikissa elintarvikeluokissa samoina vuosina.

7.2 *L. monocytogenes* -bakteerin esiintyminen kalavalmisteissa

Tässä kappaleessa tarkastellaan vuosien 2004, 2008–2009 ja 2010 kartoitusten tuloksia yhdessä. Kaikissa kalanäytteissä positiivisia näytteitä oli 22,8 % (95 % luottamusväli 20,3–25,3 %). Vuonna 2004 vastaavat luvut olivat 15,7 % (12,7–18,7 %), vuonna 2008 31,8 % (27,5–36,1 %) ja vuonna 2010 21,4 % (8,5–34,4 %). Kvantitatiivisten tulosten osalta on käsitelty vuosien 2004 ja 2008 tutkimustuloksia.

Aineistoista arvioitiin, lisäsivätkö tietyt tuotteiden ominaisuudet positiivisten näytteiden osuutta tilastollisesti merkitsevästi χ^2 -testin avulla. Testattavia ominaisuuksia olivat tuote (graavi vai kylmäsavu), siivutuskäsittely, pakkaustyyppi, kalalaji ja alkuperä (kotimainen vai ulkomainen). Positiiviset näytteet olivat jakautuneet tasaisesti graavi- ja kylmäsavukalojen välillä. Niillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ($p=0,726$). Tämä tulos oli odotettu, sillä tuotteet ovat ominaisuuksiltaan hyvin samankaltaisia lukuun ottamatta kylmäsavukalassa olevia savustuksessa syntyneitä fenoliyhdisteitä. Näiden pitoisuus (keskimäärin 10 ppm) ei yleensä yllä tasolle, jossa niillä olisi *L. monocytogenes* -bakteeria inhihoiva vaikutus, sillä tähän vaadittava pitoisuus on noin 20 ppm (Thurette *et al.*, 1998). Käsittelyistä viipalointi ja pakkaaminen vakuumi- tai suojakaasupakkaukseen lisäsivät tilastollisesti merkitsevästi prevalenssia. Viipaloituista näytteistä 26,3 % (95 % luottamusväli 23,0–30,0 %) oli *L. monocytogenes* -positiivisia, kun taas palana tai kokonaisena myydyistä tuotteista vain 15,9 % (12,1–19,7 %). Vakuumipakatuissa positiivisten osuus taas oli 26,2 % (23,0–29,5 %) kun pakkaamattomissa osuus oli 16,0 % (12,2–19,8 %). Tulos oli molemmissa tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p<0,0005$). Viipaloinnin ja pakkaamisen vakuumi- tai suojakaasupakkaukseen on jo pitkään tiedetty lisäävän *L. monocytogenes* -bakteerin määrää kalatuotteissa (katso tarkemmin kappaleesta 3.2). Kalalajeista *L. monocytogenes* -bakteeria esiintyi eniten kirjolohessa (24,9 % positiivisia näytteitä, 95 % luottamusväli 21,8–28,0 %). Lohessa positiivisia näytteitä oli 18,8 % (14,0–23,7 %) ja siiassa 11,8 % (2,6–20,9 %). Tulos oli tilastollisesti

merkitsevä ($p=0,022$). Kalan alkuperämaalla ei tämän aineiston perusteella ole suurta merkitystä *L. monocytogenes* -prevalenssille. Ulkomaisissa näytteissä positiivisia tuloksia oli enemmän (28,2 %, 95 % luottamusväli 19,9–36,5 %) kuin kotimaisissa (17,4 %, 95 % luottamusväli 9,5–25,3 %), mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkittävä ($p=0,067$). On kuitenkin huomioitava, että p-arvo oli melko pieni, jolloin ei voida täysin varmasti hylätä olettamusta, että ulkomaisissa kaloissa esiintyisi enemmän *L. monocytogenes* -bakteeria.

L. monocytogenes -positiivisten näytteiden konsentraatioita tarkasteltiin bayesiläiseen tilastomatematiikkaan perustuvan simuloinnin ja tilastollisen analyysin avulla. Kvantitatiivinen määrittäminen oli tehty yhteensä 227 (21,3 %) näytteestä, joista 85 vuodelta 2004, 141 vuosilta 2008–2009 ja yksi vuodelta 2010. Vuoden 2010 ainoassa kvantitatiivisesti määritetyssä näytteessä pitoisuus oli 110 pmy/g. Simuloinnin tuloksena saatiin ennustettu pitoisuuden jakauma *L. monocytogenes* -konsentraatiolle. Eri malleilla ja eri vuosina saadut tilastolliset tunnusluvut on esitetty taulukossa 8. Gamma-mallilla hajonta oli suurempaa kuin log-normaalilla mallilla. Pitoisuudet olivat sillä simuloituna lisäksi keskimäärin suurempia.

Taulukko 8. Eri malleilla saadut pitoisuuksien tilastolliset tunnusluvut (pmy/g) vuosien 2004 ja 2008 kalanäyteaineistolla.

| Vuosi | Malli | Pitoisuus | | | | |
|----------|--------------|-----------|--------------|----------------------|----------|-------------|
| | | Keskiarvo | Keskihajonta | 2,5 % arvo | Mediaani | 97,5 % arvo |
| 2004 | Log-normaali | 4670 | 76620 | 0,005 | 8,7 | 13820 |
| 2004 | Gamma | 17800 | 57080 | $4,2 \cdot 10^{-11}$ | 164,7 | 170300 |
| 2008 | Log-normaali | 26 | 145 | 0,03 | 2,4 | 184 |
| 2008 | Gamma | 70 | 159 | $5,4 \cdot 10^{-6}$ | 8,2 | 530 |
| yhteensä | Log-normaali | 207 | 3074 | 0,01 | 3,4 | 944 |
| yhteensä | Gamma | 6214 | 19670 | $4,1 \cdot 10^{-11}$ | 52,0 | 58640 |

Malleja vertailtiin toisiinsa DIC-arvon avulla. Vuoden 2004 aineistolla DIC-arvoksi saatiin log-normaalilla jakaumalla 172,0 ja gamma-jakaumalla 560,8, vuoden 2008 aineistolla log-normaalilla jakaumalla 172,4 ja gamma-jakaumalla 515,5 ja yhdistetyllä

aineistolla log-normaalilla jakaumalla 372,8 ja gamma-jakaumalla 1210,0. Näistä luvuista on pääteltävissä, että log-normaali jakauma kuvaa paremmin aineistoa.

Mallinnuksen etuna oli, että myös määrittäysrajan alapuolelle jääville näytteille saatiin määritettyä jakauma. Log-normaalilla mallilla saadut alle määrittäysrajan jäävien tulosten jakauman tilastolliset tunnusluvut on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. Alle määrittäysrajan jäävien pitoisuuksien mallinnetut tilastolliset tunnusluvut (pmy/g) log-normaalista mallista.

| Vuosi | Pitoisuus | | | | |
|----------|-----------|--------------|------------|----------|-------------|
| | Keskiarvo | Keskihajonta | 2,5 % arvo | Mediaani | 97,5 % arvo |
| 2004 | 2,3 | 2,6 | 0,05 | 1,2 | 9,0 |
| 2008 | 2,3 | 2,5 | 0,06 | 1,3 | 8,9 |
| yhteensä | 2,3 | 2,5 | 0,05 | 1,2 | 8,9 |

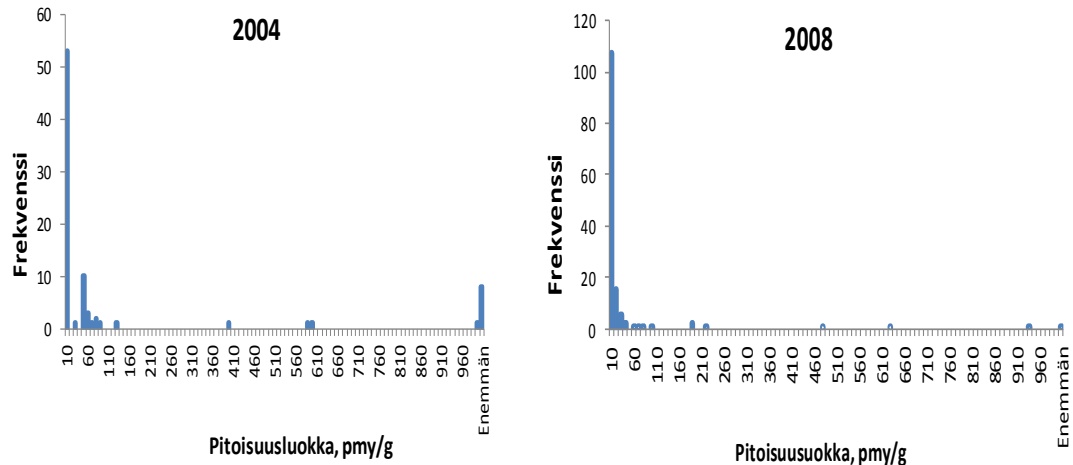
Keskiarvo, keskihajonta ja mediaani laskettiin vielä varsinaisista mittaustuloksista käyttämällä alle määrittäysrajan jääville tuloksille log-normaalista mallista simuloituja pitoisuuksista mediaania. Arvot on esitetty taulukossa 10.

Taulukko 10. Kvantitatiivisten *L. monocytogenes* -pitoisuuksien tulosten tilastolliset tunnusluvut vuosittain.

| Vuosi | Pitoisuus | | | | |
|----------|-----------|--------------|------------|----------|-------------|
| | Keskiarvo | Keskihajonta | 2,5 % arvo | Mediaani | 97,5 % arvo |
| 2004 | 4347,9 | 28858,4 | 1,1 | 1,2 | 79750,0 |
| 2008 | 59,3 | 432,3 | 1,2 | 1,3 | 547,5 |
| yhteensä | 1653,5 | 17653,4 | 1,1 | 1,3 | 3757,5 |

Keskiarvoista on huomattavissa, että vuonna 2004 pitoisuudet ovat olleet keskimäärin suurempia kuin vuonna 2008, siitäkin huolimatta, että positiivisten näytteiden osuus oli suurempi vuonna 2008 (31,8 %) kuin vuonna 2004 (15,7 %). Mediaanit olivat vuosina 2004 ja 2008 pieniä, mikä selittyy sillä, että suurella osalla näytteitä pitoisuus oli pieni. Vain noin 2 % kaikista näytteistä ja 10 % positiivista näytteistä ylitti EU:n hyväksymän raja-arvon 100 pmy/g. Määrittäysrajan alle jäi 81,1 % kaikista näytteistä.

Pitoisuuksissa olikin paljon hajontaa, mikä näkyy myös suurissa keskihajonnoissa. Vuonna 2004 pitoisuudet vaihtelivat alle 10 pmy/g:sta arvoon 250 000 pmy/g ja vuosina 2008–2009 alle 10 pmy/g:sta 5000 pmy/g asti. Jakaumat on esitetty kuvassa 7. Keskiarvo kuvaa tämän vuoksi huonosti tuloksia, sillä muutama suuri mittaustulos määrittää suuren osan keskiarvosta.



Kuva 7. Vuosien 2004 ja 2008 *L. monocytogenes* -pitoisuuksien jakauma kalatuotteissa.

7.3 *L. monocytogenes* -bakteerin esiintyminen lihatuotteissa

L. monocytogenes -bakteeria esiintyy RTE-lihatuotteissa huomattavasti vähemmän kuin kylmäsavustetuissa tai graavatuissa kalatuotteissa. Vuoden 2010 EU-kartoituksessa Suomesta ei löytynyt ainuttakaan positiivista näytettä. Vuosien 2012–2013 793 tutkitun lihatuotteen joukosta löytyi ainoastaan kymmenen positiivista näytettä, joista seitsemässä pitoisuus jäi määritysrajan alapuolelle, yhdestä ei ollut tehty kvantitatiivista määritystä ja kahdesta näytteestä tuloksia ei ollut ilmoitettu, vaikka kvantitatiivinen määritys oli merkitty tehdyksi.

Analyysejä varten vuoden 2010 lihatuoteaineistosta valittiin ne näytteet, jotka täyttävät vuosien 2012–2013 kartoituksen kriteerit. Pois jätettiin siis näytteet, jotka

oli pakattu normaali-ilmakehään tai joita ei ollut siivutettu. Tästä aineistosta testattiin ristiintaulukoinnilla ja χ^2 -testillä, lisääkö pakkaustyyppi, eläinlaji, kylmäsavustus tai alkuperämaa *L. monocytogenes* -bakteerin esiintymistä tilastollisesti merkitsevästi. Näytteisiin oli valittu kahdenlaisia pakkaustyypppejä: vakuumi- ja suojakaasupakkauksia. Vakuumpakatuissa tuotteissa positiivisia näytteitä oli hieman enemmän (2,9 %, 95 % luottamusväli 0,07–5,8 %) kuin suojakaasupakatuissa (0,9 %, 0,2–1,5 %), mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p=0,107$). Eläinlajeista porossa esiintyi enemmän (7,1 %) *L. monocytogenes* -bakteeria kuin muista eläinlajeista tehdyissä tuotteissa (0–2,2 %), mutta poronäytteitä oli tutkittu vain 14 ja tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p=0,333$). Kylmäsavustetuissa ja kylmäsavustamattomissa tuotteissa oli suunnilleen sama määrä positiivisia näytteitä. Ainoa tilastollisesti merkitsevä ero löytyi alkuperämaan kohdalta. Ulkomaisissa tuotteissa positiivisia näytteitä oli 5,7 %, kun taas kotimaisissa tuotteissa vain 0,5 % ($p<0,0005$).

7.4 *L. monocytogenes* -bakteerin esiintyminen maitotuotteissa

Kaikkiaan 183 raakamaitonäytteestä vuodelta 2011 kymmenestä oli löytynyt *L. monocytogenes* -bakteeria (5,5 %; 95 % luottamusväli 2,1–8,8 %). Pitoisuudet olivat välillä 1–30 pmy/ml (Ruusunen *et al.*, 2013). Vaikka pitoisuudet ovat pieniä, on kuitenkin huomioitava, että näytteet oli kerätty meijeristä eikä vähittäismyynnistä, jolloin *L. monocytogenes* -bakteeria ei saisi esiintyä tuotteessa lainkaan. *L. monocytogenes* -bakteeria löytyi sekä raakamaidosta, jossa oli korkea yleinen bakteeripitoisuus ($2,3 \cdot 10^6$ pmy/ml) ja raakamaidosta, jossa yleinen bakteeripitoisuus oli alhainen ($2,1 \cdot 10^3$ pmy/ml). Koko aineistossa raakamaidon kokonaisbakteerimäärä vaihteli välillä $1,2 \cdot 10^2$ – $3,0 \cdot 10^6$ pmy/ml. Siten raakamaidon yleinen hygieniataso ei välttämättä ennusta *L. monocytogenes* -bakteerin esiintymistä. Saman havainnon olivat tehneet jo Ruusunen *et al.* (2013). Muihin tuotteisiin verrattuna raakamaidossa

esiintyi vähemmän *L. monocytogenes* -bakteeria kuin kylmäsavustetuissa tai graavatuissa kalatuotteissa mutta enemmän kuin lihatuotteissa.

Raakamaito näyttäisi olevan maitotuotteista eniten kontaminoitunut *L. monocytogenes* -bakteerilla. Patogenixin mukaan kaikista tutkituista maito- ja maitotuotenäytteistä vain 0,15 % oli *L. monocytogenes* -positiivisia. Näistä lähes 70 % oli myös löydetty käsittelemättömästä maidosta. Pastöroidusta tai kuumennetusta maidosta tai prosessoiduista tuotteista löytyy siis tämän perusteella alle 1 % *L. monocytogenes* -bakteeria. Muiden maitotuotteiden vähäistä *L. monocytogenes* -esiintymistä tukee myös se, että vuoden 2010 EU-kartoituksessa homejuustoista ei löydetty lainkaan *L. monocytogenes* -bakteeria.

Raakamaitoa on tutkittu myös muissa Euroopan maissa. Esimerkiksi vuonna 2004 Puolassa testattiin 2474 näytettä, joista *L. monocytogenes* -positiivisia oli 0,04 % ja Unkarissa 2285 näytettä, joista positiivisia oli alle 2 % (Anon., 2005). Vuonna 2005 Itävallassa, Belgiassa, Saksassa, Italiassa, Latviassa ja Puolassa oli testattu 30–164 näytettä maittain. Näistä löytyi positiivisia näytteitä 0–4,4 % (Anon., 2006). Pitoisuudet ovat siis olleet pienempiä tai samaa luokkaa kuin Suomessa. Myös paljon isompia prevalensseja on kuitenkin löydetty Euroopan alueelta. Virossa vuonna 2013 tutkituista maitotankeista kerätyistä näytteistä 28,5 % ja *in line* maidon suodattimista 36 % olivat *L. monocytogenes* -positiivisia. Näytteitä oli kerätty 14 tilalta (Kalmus *et al.*, 2015).

Epävarmuutta kaikkiin pitoisuusaineistoihin aiheuttaa näytteiden otanta ja määrä. Etenkin, jos näytemäärä tai *L. monocytogenes* -bakteerin prevalenssi ovat pieniä, sattuman merkitys näytteen edustavuudessa kasvaa. Näistä aineistoista esimerkiksi vuoden 2010 aineistossa tutkittuja näytteitä oli vähän. Toinen vaikuttava tekijä on väärät negatiiviset ja positiiviset tulokset, jotka aiheutuvat analyysimenetelmästä. Esimerkiksi ISO 11290 -standardin mukaan suoritettussa analyysissä herkkyudeksi on määritetty noin 86 % ja selektiivisyydeksi noin 97 %. Vääriä negatiivisia tuloksia

saadaan etenkin, jos näytteessä on kilpailevaa bakteerikasvustoa, joka estää *L. monocytogenes* -bakteerin kasvua (Scotter *et al.*, 2001).

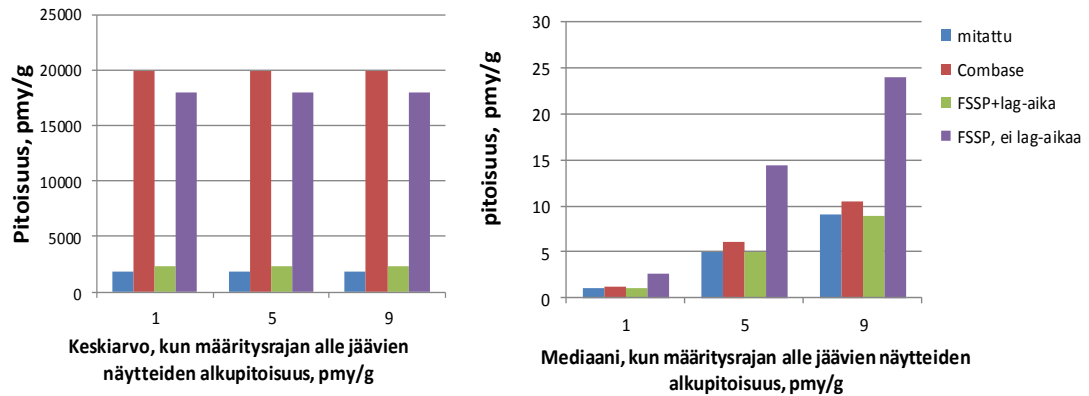
7.5 Mallintaminen FSSP- ja Combase-malleilla

Mallinnuksen avulla tarkasteltiin kahta asiaa. Ensimmäiseksi, pitoisuustiedoista pyrittiin ennustamaan, mikä olisi näiden aineistojen mittausten perusteella maksimikonsentraatio, jonka *L. monocytogenes* -pitoisuus voisi tutkituissa tuotteissa saavuttaa. Toiseksi, mallinnuksen avulla tarkasteltiin säilytyslämpötilan merkitystä *L. monocytogenes* -bakteerin kasvulle.

7.5.1 *L. monocytogenes* -bakteerin kasvu kohde-elintarvikkeissa

Mallinnuksella tarkasteltiin vuosien 2004 ja 2008 kalanäytteitä sekä vuoden 2010 lihanäytteitä. Olettamalla määritysrajan alle jäävät tulokset pitoisuudeltaan määritysrajan alarajaksi, keskiväliksi ja ylärajaksi saatiin tietoa teoreettisesta vaihteluvälistä, jonka pitoisuudet voisivat saada. Kun mittauksista saatujen kalanäytteiden tulosten keskiarvo oli näillä oletuksilla vastaavassa järjestyksessä 1 808, 1 813 ja 1 819 pmy/g, nousi se Combase-mallilla ennustettaessa 19 882, 19 896 ja 19 909 pmy/g ja FSSP-mallilla 2 343–17 995, 2 349–18 017 ja 2 354–18 044 pmy/g (lag-ajalla/ilman lag-aikaa). Keskiarvot on esitetty kuvassa 8. Siten Combase-mallilla ennustettaessa pitoisuudet keskimäärin 11-kertaistuivat ja FSSP-mallilla lag-ajalla 1,2-kertaistuivat ja ilman lag-aikaa 10-kertaistuivat viimeiseen käyttöpäivään mentäessä. Mediaanit mitatuilla pitoisuuksilla olivat 1, 5 ja 9 pmy/g, kun edelleen lasketaan alle määritysrajan jäävät tulokset kolmessa osassa. Comabase-mallilla vastaavat ennustetut arvot olivat 1, 6 ja 10 pmy/g ja FSSP-mallilla 1–3, 5–14 ja 9–25 pmy/g. Mediaanit on esitetty kuvassa 8. Laissa määritetyn 100 pmy/g raja-arvon ylittävien osuuden muutos vaihteli hyvin paljon riippuen mallista ja lähtöoletuksista. FSSP lag-ajalla mallinnuksen mukaan jopa vähensi raja-arvon ylittäneiden osuutta

noin 9 %. Combasella mallinnettaessa 100 pmy/g ylittävien osuus kasvoi noin 5–27 %, jolloin kyseisen pitoisuuden ylittäneitä näytteitä olisi korkeintaan 2,6 % kaikista näytteistä. Isoimmat pitoisuuden 100 pmy/g ylittävien osuuden kasvamiset tapahtuivat FSSP:llä ilman lag-aikaa. Osuudet kasvoivat 41–109 % riippuen lähtöpitoisuudesta. Tällöin isoin 100 pmy/g ylittäneiden osuus olisi 4,6 %.



Kuva 8. Kalanäytteiden mitatut ja ennustetut *L. monocytogenes* -pitoisuuksien keskiarvot (vasen) ja mediaanit (oikea), kun alle määrittämissä rajoissa olevien tulokset on oletettu 1, 5 tai 9 pmy/g:ksi.

Lihanäytteissä pitoisuudet olivat kalanäytteitä huomattavasti pienemmät ja lihanäytteistä vain seitsemästä oli tehty kvantitatiivinen määrittäminen. Kaikki tulokset olivat jääneet alle määrittämissä rajoissa. Myös mallinnetut pitoisuudet jäivät pieneksi. Edes olettamalla alkupitoisuus 9 pmy/g:ksi yksikään näyte ei ylittänyt 100 pmy/g raja-arvoa. Keskiarvoissa ja mediaaneissa ei tapahtunut oleellisia muutoksia. Lihatuotteilla *L. monocytogenes* -pitoisuutta pienentää kuumennuskäsittely, joka tuhoaa raaka-aineessa mahdollisesti olevat listeriabakteerit. Siten ainoaksi kontaminaatiotavaksi jää jälkikontaminaatio, jonka määrää pystytään kuitenkin pienentämään hyvällä hygienialla.

Jos tarkastellaan määrittämissä alle jäävien tulosten 5 pmy/g:ksi olettamalla tehtyjä mallinnustuloksia, huomataan, että alhaisimmat ennustearvot saatiin keskimäärin FSSP-mallilla, jossa oli käytetty lag-aikaa. (Pitoisuus ei vaikuta kummassakaan mallissa itse mallinnukseen, joten tulokset ovat yleistettävissä myös muille pitoisuuksille.) Isoimmat pitoisuudet saatiin keskimäärin Combase-mallilla ja FSSP ilman lag-aikaa sijoittui näiden kahden väliin. Tilastollisesti mallit korreloivat toisiinsa. FSSP:llä ilman lag-aikaa oli vahvempi korrelaatio ($r=0,98$; $p<0,01$) Combase-malliin kuin FSSP:llä lag-ajan kanssa ($r=0,47$; $p<0,01$).

7.5.2 Säilytyslämpötilan vaikutus *L. monocytogenes* -bakteerin kasvuun

Aineistosta oli huomattavissa, että kalavalmisteiden säilytyslämpötiloissa oli ollut puutteita. Elintarvikelain (1367/2011) 3. luvun 7 § on säädetty, että kylmäsavustetut ja tuoresuolatut sekä tyhjiö- ja suojakaasupakatut kalastustuotteet on säilytettävä 0–3 °C:ssa. Kaikista kalanäytteistä suuri osa ei täyttänyt tätä vaatimusta. 56,5 % näytteistä oli säilytetty kaupassa yli 3 °C:ssa. 41,2 % näytteistä oli säilytetty lain vaatimassa lämpötilassa ja 2,3 % näytteistä lämpötilatieto puuttui. Suurin mitattu lämpötila oli 14,3 °C (vuonna 2004). Tutkimusvuosien 2004 ja 2008–2009 välillä ei ollut juuri eroja säilytyslämpötiloissa. Molempina vuosina näytteistä hieman alle 60 % oli säilytetty liian korkeassa lämpötilassa ja noin 40 % oikeassa lämpötilassa. Lämpötilojen keskiarvo oli noin 4 °C molemmissa tutkimuksissa. Vuonna 2010 lämpötilat olivat tulleet lähemmäs lain vaatimia lämpötiloja. Näytteistä 40 % oli säilytetty liian korkeassa lämpötilassa ja 60 % lain vaatimassa lämpötilassa. Lämpötilojen keskiarvo oli edelleen liian korkea, 3,5 °C, mutta pienempi kuin edellisissä tutkimuksissa. Tutkittuja kylmäsavu- ja graavikalanäytteitä tosin oli ainoastaan 42.

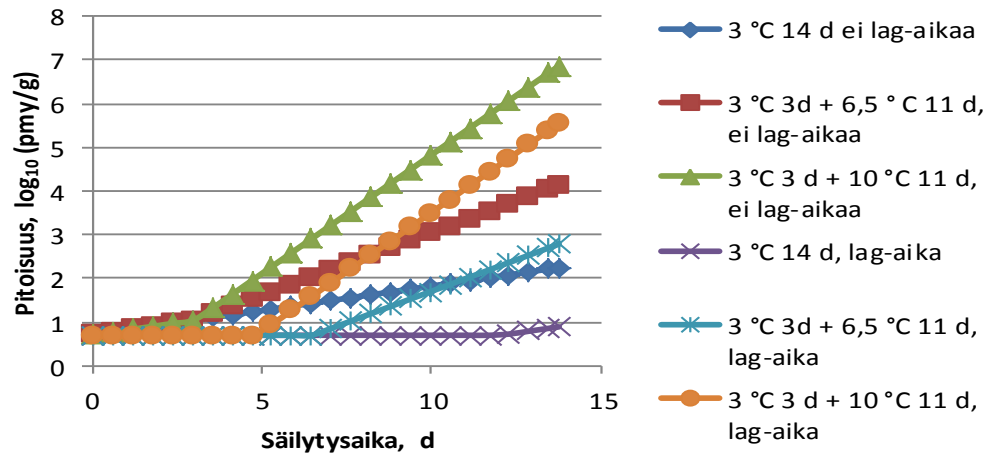
Lihanäytteet täyttivät kalanäytteitä huomattavasti paremmin lain vaatimat säilytyslämpötilat. Elintarvikelain (1367/2011) 3. luvun 7 § mukaan helposti

pilaantuvat elintarvikkeet tulee säilyttää alle 6 °C:ssa. Vuosien 2010 ja 2012–2013 aineistoista 13,7 % näytteistä ei täyttänyt tätä vaatimusta. Näytteiden säilytyslämpötilan keskiarvo oli alle sallitun ylärajan (4,0 °C). Yksittäisiä ylityksiä oli silti aineiston joukossa, korkein mitattu lämpötila oli 12,8 °C.

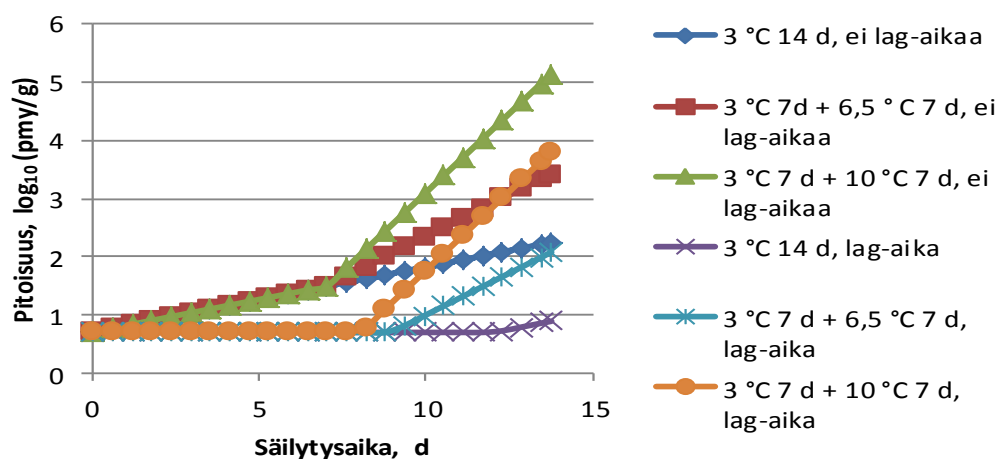
Liian korkea säilytyslämpötila ei kuitenkaan korreloinut *L. monocytogenes* -bakteerin esiintymisen kanssa. Tilastollisesti yli 3 °C:ssa säilytetyissä tuotteissa ei ollut merkitsevästi enemmän positiivisia tuloksia ($p=0,244$, χ^2 -testi) tai 100 pmy/g raja-arvon ylittäneitä tuloksia ($p=0,319$, χ^2 -testi). Lämpötilalla ja *L. monocytogenes* -pitoisuudella ei ollut myöskään lineaarista korrelaatiota ($r=0,1$; $p=0,141$; *bivariate correlation*). Tämä selittyy sillä, että säilytyslämpötila ei vaikuta siihen, esiintyykö raaka-aineessa valmiiksi *L. monocytogenes* -bakteeria tai mikä on sen alkupitoisuus. Yksittäistapauksissa korkea säilytyslämpötila voi kuitenkin lisätä *L. monocytogenes* -bakteerin määrää elintarvikkeessa vaaralliselle tasolle. Esimerkiksi 5000 pmy/g pitoisuus kasvoi 10 °C:ssa viiden päivän aikana pitoisuuteen $2,6 \cdot 10^6$ pmy/g. Jos tällaista tuotetta syötäisiin viimeisenä käyttöpäivänä 100 g annos, saatu bakteerimäärä olisi $2,6 \cdot 10^8$ pmy. Etenkin riskiryhmillä tällainen määrä voi jo riittää aiheuttamaan sairautta (katso kappale 3.1).

Säilytyslämpötilalla on suuri merkitys *L. monocytogenes* -bakteerin kasvun kannalta. FSSP-mallin mukaan kalatuotteille taulukon 7 arvoilla (ilman fenoliyhdisteitä) laskettuina solujen määrän satakertaistuminen vie 2 °C:ssa 26, 5 °C:ssa 10 ja 10 °C:ssa enää 4 päivää. Lag-ajat vähenevät 2 °C:sta 10 °C:een tultaessa 16 päivästä yhteen päivään. Lag-aikojen riippuvuuden lämpötilasta kylmissä olosuhteissa huomasivat myös Robinson *et al.* (1998). Eviran suosituksen mukaan graavi- ja kylmäsavutuotteiden myyntiaika tulisi olla 10–14 päivää (Anon., 2000). Liian suurissa lämpötiloissa *L. monocytogenes* -solut ehtivät siten tässä ajassa päästä ohi lag-vaiheesta ja kasvaa merkittävästi tuotteessa, vaikka alkupitoisuus olisi pieni.

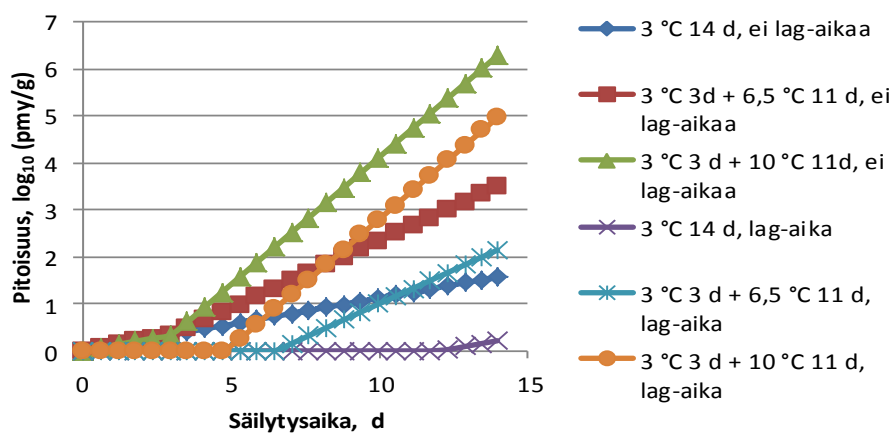
Tilanne, jossa tuotteita säilytetään kaupassa kulutuspäivään asti, ei välttämättä kuvaa todellista tilannetta. On todennäköisempää, että kuluttajat säilyttävät tuotetta jääkaapissaan jonkin aikaa ennen käyttöä. Tätä simuloitiin erilaisten lähtöoletusten pohjalta (katso kappale 6.3.3). Simulointien tulokset on esitetty kuvissa 9, 10 ja 11.



Kuva 9. FSSP:llä mallinnettu *L. monocytogenes* -bakteerin kasvu kalatuotteissa kahden viikon aikana lähtöoletuksella, että tuotetta on ensin säilytetty valmistajalla 3 °C lämpötilassa kolme päivää ja sen jälkeen kuluttajan jääkaapissa eri lämpötiloissa viimeiseen käyttöpäivään asti (11 päivää). Alkukonsentraatioksi valittu 5 pmy/g, muut arvot taulukon 7 mukaan.



Kuva 10. FSSP:llä mallinnettu *L. monocytogenes*-bakteerin kasvu kalatuotteissa kahden viikon aikana lähtöoletuksella, että tuotetta on ensin säilytetty valmistajalla 3 °C lämpötilassa seitsemän päivää ja sen jälkeen kuluttajan jääkaapissa eri lämpötiloissa viimeiseen käyttöpäivään asti (seitsemän päivää). Alkukonsentraatioksi valittu 5 pmy/g, muut arvot taulukon 7 mukaan.

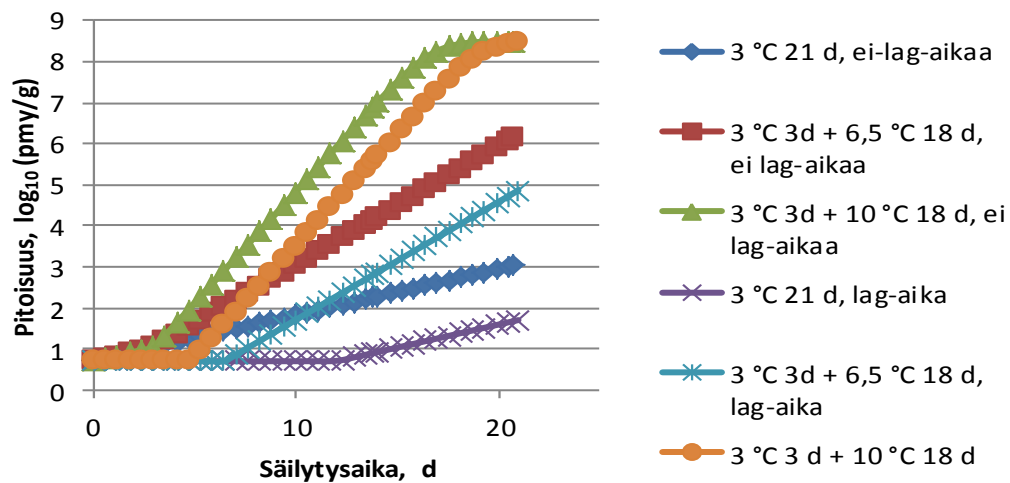


Kuva 11. FSSP:llä mallinnettu *L. monocytogenes*-bakteerin kasvu kalatuotteissa kahden viikon aikana lähtöoletuksella, että tuotetta on ensin säilytetty valmistajalla 3 °C lämpötilassa kolme päivää ja sen jälkeen kuluttajan jääkaapissa eri lämpötiloissa viimeiseen käyttöpäivään asti (11 päivää). Alkukonsentraatioksi valittu 1 pmy/g, muut arvot taulukon 7 mukaan.

Kuvista 9 ja 10 huomataan, että liian korkeissa lämpötiloissa säilytettynä 5 pmy/g alkupitoisuus pystyi ylittämään 100 pmy/g raja-arvon (kuvisa log-arvon 2).

Esimerkiksi EFSA:n tutkimuksen (Anon., 2007b) mukaisessa kotijääkaappien keskilämpötilassa 6,5 °C pitoisuus ylitti tämän arvon 5–11 päivässä (kuva 9), jos oletetaan, että tuotetta on säilytetty 3 °C lämpötilassa tuotteen valmistajalla ja kuljetusketjun ajan ja tuotetta ei ole säilytetty vähittäismyynnissä. Erot ajanjaksossa riippuivat siitä, oliko *L. monocytogenes* -bakteerille mallinnettu lag-aika vai ei. Jos jääkaapin lämpötila oli tätä korkeampi, 10 °C, ylitykseen kului enää noin 5–7 päivää. Siinäkin tapauksessa, että säilytysaikaa 3 °C:ssa lisättiin seitsemään päivään (kuva 10), loppuajan korkeampi säilytyslämpötila riitti nostamaan pitoisuuden arvoon yli 100 pmy/g. Lämpötilassa 6,5 °C tähän meni noin 9–13 päivää ja 10 °C noin 8–10 päivää. Alukonsentraation pienentämisellä 1 pmy/g:aan oli vain pieni merkitys pitoisuuksille. Myös tässä tapauksessa kaikissa yli 3 °C lämpötiloissa suoritetuissa mallinnoissa pitoisuus nousi yli 100 pmy/g.

Kylmäsavustettu lohi voi kuitenkin säilyä aistinvaraisesti kelvollisina jopa 7–8 viikkoa 5 °C:n lämpötilassa ja 5–6 viikkoa 10 °C:n lämpötilassa (Hansen *et al.*, 1995). Tässä oletettiin, että sama pätee myös graavisuolattuun loheen ja muihin kalalajeihin. On siis mahdollista, että syödyksi tulee myös yli kaksi viikkoa säilytettyä kalaa, joko kuluttajan omalla päätöksellä tai valmistajan asettaman viimeisen käyttöpäivämäärän mukaan. Tämän vuoksi simulointi suoritettiin myös kolmeen viikkoon asti (kuva 12). Mallinnuksen mukaan jopa 3 °C säilytetty kalatuote pääsi kasvuvaiheeseen, vaikka pitoisuus jäikin vielä kolmen viikon kohdalla arvoon noin 50 pmy/g. Korkeammissa lämpötiloissa kasvu oli huomattavaa. Alimmankin ennusteen mukaan 6,5 °C:n lämpötilassa pitoisuus oli kolmen säilytysviikon jälkeen $7,2 \cdot 10^4$ pmy/g. Lämpötilassa 10 °C määrä kasvoi arvoon noin $3 \cdot 10^8$ pmy/g lag-ajasta riippumatta. Kuvaajasta nähdään, että tässä lämpötilassa solut olivat jo saavuttamassa kasvun stationaarivaihetta eli ne olivat saavuttaneet maksimikonsentraationsa.



Kuva 12. FSSP:llä mallinnettu *L. monocytogenes* -bakteerin kasvu kalatuotteissa kolmen viikon aikana lähtöoletuksella, että tuotetta on ensin säilytetty valmistajalla 3 °C lämpötilassa kolme päivää ja sen jälkeen kuluttajan jääkaapissa eri lämpötiloissa 18 päivän ajan. Alkukonsentraatioksi valittu 5 pmy/g, muut arvot taulukon 7 mukaan.

Tuloksissa oli monta epävarmuustekijää. Pitoisuusmallinnuksissa lämpötilana käytettiin vakiolämpötilaa, joka oli mitattu vähittäismyynnissä. Lämpötilat vähittäismyynnissä vaihtelivat välillä -4,0–14,3 °C. Näytteitä oli kuitenkin saatettu säilyttää laboratoriossa (0–3 °C) näytteenkeruupäivästä analyysipäivämäärään asti, jolloin bakteerien kasvu on saattanut hidastua tai kasvaa riippuen siitä, onko laboratoriossa ollut kylmempi vai lämpimämpi säilytyslämpötila kuin vähittäismyyntipisteessä. Toiseksi, aineistossa analyysipäivän aloittamiselle oli merkitty vain yksi päivämäärä. Ei ollut kuitenkaan täsmennetty, onko kyseessä kvalitatiivisen vai kvantitatiivisen analyysin aloitus. Täten mallinnusajoissa saattaa olla virheitä. Kolmanneksi, näytteiden suolapitoisuus, fenolipitoisuus ja pH oletettiin vakioarvoiksi sekä säilöntäaineet kokonaan puuttuviksi, vaikka niitä yleisesti käytetään kalatuotteissa. Kaikki voivat vaikuttaa *L. monocytogenes* -bakteerin kasvuun (katso kappale 3.2.) Luonnollisesti myös oletamus, että kaikki määräysrajan alapuolelle jääneet tulokset saisivat tietyn vakioarvon, on virheellinen. Lisäksi alhaisin

mahdollinen pitoisuus, joka positiivisessa näytteessä saattoi olla, ei ole teoreettisesti 1 vaan 0,04 pmy/g (1 pmy/25 g näytettä). Pitoisuus 1 pmy/g kuitenkin valittiin, sillä se on Combasen alaraja ja näin eri mallien tuloksista saatiin vertailukelpoisia toisiinsa.

L. monocytogenes -bakteerin lag-ajan pituus elintarvikkeissa on edelleen epäselvä. Mallintaminen on vaikeaa, sillä siihen vaikuttavat monet tekijät, jotka ovat sekä solusta itsestään että ympäristötekijöistä johtuvia. Esimerkiksi *L. monocytogenes* -kanta ja solujen historia vaikuttavat lag-ajan pituuteen (Begot *et al.*, 1997). Ympäristöstä johtuvia tekijöitä taas ovat esimerkiksi elintarvikkeelle tehdyt käsittelyt, kuten kuumennus, suolaus tai säilöntäaineiden lisäys (Guillier *et al.*, 2005). Siten lag-ajan mallintaminenkin on hyvin hankalaa, koska näytteiden historia on tuntematon ja elintarvikkeista puuttuu osa tiedoista. FSSP-mallin kehittäjien mukaan realistisimman mallinnuksen saa lag-ajan kanssa (Anon., 2014i). On tosin myös huomioitava, että esimerkiksi Membre *et al.* (1999) tutkimuksessa lag-aikaa ei ollut lainkaan kylmissä olosuhteissa. Lisäksi tässä diplomityössä käytettyjen aineistojen näytteitä oli jo säilytetty myyntiajan verran, jolloin on mahdollista, että solut ovat siirtyneet jo kasvuvaiheeseen. Siten olettamalla mallinnuksessa lag-ajan puuttuvaksi saadaan ”varman päälle” -arvio siitä, mikä *L. monocytogenes* -pitoisuus voisi korkeintaan olla.

7.6 Tutkittujen elintarvikkeiden aiheuttama *L. monocytogenes* -altistuksen taso suomalaisille

Keskimääräinen suomalainen syö vuodessa noin 800 g graavisuolattuja ja kylmäsavustettuja kalatuotteita. Kuukaudessa tämä tekee alle 70 g, mistä voidaan olettaa, että syödyt annokset ovat todennäköisesti melko pieniä. Tyypillinen annos voisi olla esimerkiksi yhdestä kahteen siivua, jolloin annoksen paino voisi olla noin 25–50 g. Jos tarkastellaan isompia pitoisuuksia, joita kalatuotteista on löydetty, esimerkiksi P(97,5 %)-arvon (3 757,5 pmy/g) mukaan saatu bakteeriannos olisi tällöin

noin $9,4 \cdot 10^4$ – $1,8 \cdot 10^5$ pmy. Suurin osa pitoisuuksista on kuitenkin pieniä, esimerkiksi mediaanin (3,4 pmy/g) mukaan laskettuna annos olisi vain 85–170 pmy.

Keskiarvoisesta kulutuksesta ei voida päätellä, miten paljon riskiryhmät kuluttavat tutkittuja elintarvikkeita verrattuna muuhun väestöön. Suomessa riskiryhmiä on ohjeistettu välttämään riskituotteita tai nauttimaan ne kuumennettuna (Anon., 2013a). Suosituksen noudattamisesta ei kuitenkaan ole varmuutta. Esimerkiksi EFSA:n ruoankäyttötietokannan mukaan suomalaiset vanhukset (65–74-vuotiaat) syövät keskimäärin 10 g enemmän kalaa päivässä kuin aikuiset (25–64-vuotiaat). Lapset puolestaan syövät vähemmän kalaa kuin aikuiset ja vanhukset (Anon., 2011b). Tietokannassa ei ole kuitenkaan eritelty, mitä kalaa on syöty. On siis mahdollista, että riskiryhmien edustajat syövät graavisuolattuja ja kylmäsavustettuja kalatuotteita suosituksista huolimatta. Tätä oletusta tukee sekin, että suuri osa listerioosiin sairastuneista Suomessa on yli 65-vuotiaita.

Raakamaidossa sekä *L. monocytogenes* -prevalenssi (5,5 %) että konsentraatiot (korkeintaan 30 pmy/g) ovat pienempiä kuin kalatuotteissa. Raakamaitoa kuitenkin kulutetaan huomattavasti graavisuolattuja ja kylmäsavustettuja kalatuotteita enemmän (5,2 kg/henkilö/vuosi). Kulutus on lisäksi jakautunut epätasaisesti. Raakamaidossa on todennäköisesti myös suuremmat annoskoot kerralla kuin kalatuotteissa (esimerkiksi 2 dl lasillinen raakamaitoa painaisi noin 200 g). Siten etenkin liian lämpimässä tai liian pitkään säilytetty raakamaito saattaa altistaa kuluttajan *L. monocytogenes* -bakteerille.

Lihatuotteissa sekä *L. monocytogenes* -prevalenssi (1,3 %) että konsentraatiot (alle 10 pmy/g) ovat pieniä. Lisäksi voidaan olettaa, että annoskoot ovat ainakin siivutetuilla lihatuotteilla keskimäärin pieniä (esimerkiksi leikkeleen käyttö leivän päällä). Siten lihatuotteiden kohdalla altistus *L. monocytogenes* -bakteerille jäänee alhaiseksi.

Tilastotiedosta tulee kuitenkin todennäköisesti liian iso arvio altistuksen tasolle. Tämä johtuu siitä, että kaikki tuotettu elintarvike ei välttämättä päädy kulutukseen, vaan osa ehtii pilaantua ennen tätä. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuslaitoksen raportin mukaan poisheitetyn ruoan määrät ovat merkittäviä. Kotitaloudet heittävät keskimäärin 5 % kaikesta ostamastaan ruoasta, mutta tästä luvusta vielä isompi osuus on herkästi pilaantuvia elintarvikkeita. Elintarviketeollisuudessa hävikki on noin 3 %. Lisäksi hävikkiä syntyy vähittäismyynnissä (Silvennoinen *et al.*, 2012). Altistusta vähentää myös se, että osa tuotteista saatetaan kuumentaa ennen syömistä, mikä tuhoaa listeriabakteerit elintarvikkeesta. Toisaalta myös itse tehty graavikala voi olla *L. monocytogenes* -kontaminoitunut. Kulutus ei kuitenkaan näy kalatuotetilastoissa. Itse tehdyn graavikalan kulutusta on kuitenkin vaikea arvioida, joten se on tässä oletettu merkityksettömän pieneksi.

Tässä diplomityössä ei käsitelty tarkemmin eri *L. monocytogenes* -serotyyppejä. Niillä on kuitenkin merkitystä sairastumisen kannalta. Serotyypeistä vain kolme kolmestatoista aiheuttaa suurimman osan sairauksista. Nämä vastaavat jopa 90 % sairaustapauksista (katso kappale 3.1). Siten olettamalla kaikki elintarvikkeista löydetty serotyypit yhtä virulenteiksi saadaan liian suuri arvio altistukselle.

8 Johtopäätökset

Tämän diplomityön tavoitteena oli käydä läpi riskinarvioinnin muodossa erilaisiin RTE-elintarvikkeisiin liittyen *L. monocytogenes* -tutkimustuloksia ja selvittää niiden *L. monocytogenes* -prevalenssia ja -konsentraatiota sekä tilastollisin menetelmin että mallinnuksen avulla. Tilastoidun kulutuksen perusteella arvioitiin kuluttajien altistumista *L. monocytogenes* -bakteerille altistusta erilaisista tutkituista tuoteryhmistä. Riskinarvioinnin näkökulmasta tämä diplomityö kattoi vaaran

tunnistamisen, vaaran kuvaamisen ilman kvantitatiivista annosvastetta sekä altistuksen arviointia.

Hyvinkin erilaisista elintarvikeryhmistä löydetään *L. monocytogenes* -bakteeria. Suuri osa listeriakartoituksista kohdistuu kuitenkin graavisuolattuihin ja kylmäsavustettuihin kalatuotteisiin. Esimerkiksi Patogenixin mukaan positiivisia näytteitä löytyi kalatuotteiden jälkeen eniten valmisruoista, vilja- ja leipomovalmisteista sekä hedelmistä ja vihanneksista. Näitä ryhmiä ei ole juuri tarkemmin tutkittu. Lisäksi joitakin elintarvikeryhmiä, kuten juomia tai munia ja munavalmisteita, ei ole tutkittu juuri lainkaan (muutamia kymmeniä). Jos haluttaisiin tietää, sisältävätkö nämä ryhmät piileviä riskejä, niitä tulisi tutkia tarkemmin. Erityisesti ryhmässä vilja- ja leipomovalmisteet tutkittuja näytteitä oli vähän (387), vaikka positiivisia näytteitä löytyi 2,07 % eli kolmanneksi eniten Patogenixiin listatuista elintarvikeryhmistä.

Graavisuolatuissa ja kylmäsavustetuissa kalatuotteissa oli tutkituista kolmesta elintarvikeryhmästä suurin *L. monocytogenes* -prevalenssi: noin viidesosa näytteistä oli positiivisia. Viipaloiduissa ja pakatuissa lihatuotteissa sekä raakamaidossa prevalenssit olivat pieniä. *L. monocytogenes* -prevalenssia kalatuotteissa lisäsi tilastollisesti merkitsevästi pakkaaminen suojakaasu- tai vakuumpakkaukseen sekä viipalointi. Näiden merkitys on ollut pitkään tiedossa ja riskiryhmiä onkin kehoitettu välttämään kyseisiä tuotteita (Anon., 2013a). Lihatuotteiden kohdalla kaikki tutkitut tuotteet olivat tyhjiö- tai suojakaasupakattuja ja siivutettuja. Tilastollisesti merkitsevästi *L. monocytogenes* -prevalenssia lisäsi lihatuotteiden kohdalla valmistus ulkomailla kotimaiseen verrattuna. Kalatuotteissa ero valmistusmaassa ei ollut tilastollisesti merkitsevä. *L. monocytogenes* -konsentraatiot olivat kaikissa tutkituissa elintarvikeryhmissä keskimäärin melko matalia. Suurin osa kaikista mitatuista pitoisuuksista jäi alle määritysrajan. Yksittäisiä 100 pmy/g ylityksiä oli silti

kalatuoteryhmässä. Pitoisuudet olivat kuitenkin pienentyneet vuosien 2004 ja 2008–2009 välillä. Lihatuotteissa kaikki pitoisuudet jäivät alle määritysrajan.

Pitoisuuksiin vaikuttaa kuitenkin olennaisesti säilytyslämpötila, mitä tässä diplomityössä tarkasteltiin pitoisuussimulointien avulla kahdella eri mallilla. Lähtöoletuksista riippuen pitoisuus kasvoi mittauspäivästä viimeiseen käyttöpäivään simuloituna keskimäärin jopa 10–11-kertaiseksi. Varovaisemman arvion mukaan pitoisuudet kasvoivat vain 1,2-kertaiseksi. Käytetyistä malleista FSSP:llä tuli maltillisempia tuloksia kuin Comabasella. Koska FSSP:ssä malli oli koostettu elintarvikkeilla tehdyillä kokeilla, sen käyttö on suositeltavampaa verrattuna Combaseen, jossa malli pohjautui kasvatusliemillä tehtyihin kokeisiin. Yksittäisissä tapauksissa *L. monocytogenes* -bakteerin mallinnettu kasvu saattoi olla hyvinkin merkittävää. Liian korkeassa lämpötilassa pienikin pitoisuus saattoi simulointien perusteella kasvaa merkittävään pitoisuuteen. Sekä kuluttajien jääkaapeissa että vähittäismyynnissä kalatuotteiden säilytyslämpötilat ovat olleet yleisesti liian korkeita suosituksiin nähden. Tämän seurauksena *L. monocytogenes* -konsentraatio voi kasvaa suositellun enimmäissäilytysajan aikana yli sallitun rajan ja siten suurentaa altistusta.

Tähän ongelmaan voidaan vaikuttaa kahdella tavalla: muuttamalla suositeltuja säilytysaikoja sekä valistamalla kuluttajia ja vähittäismyynnin edustajia, jotta säilytyslämpötilat saadaan oikeiksi. Jos esimerkiksi suositussäilytysaikaa lyhennettäisiin nykyisestä 10–14 päivästä seitsemään päivään, 5 pmy/g alkupitoisuus ei mallinnuksen perusteella ehtisi kasvaa yli 100 pmy/g pitoisuuteen. Valistamalla voidaan yrittää vaikuttaa säilytyslämpötilojen oikeellisuuteen ja kuluttajien käytökseen. Esimerkiksi kuluttajia voidaan neuvoa säätämään jääkaappien lämpötilaa tai kertoa eroista jääkappien lämpötiloissa eri osissa kaappia. Vastaavasti voidaan neuvoa, että avatut pakkaukset eivät säily yhtä kauan kuin avaamattomat, vaan avatussa pakkauksessa mikrobit kasvavat nopeammin.

Altistus *L. monocytogenes* -bakteerille oli näiden tulosten perusteella arvioitu isoimmaksi elintarvikeryhmässä graavisuolatut ja kylmäsavustetut kalatuotteet, sillä niissä prevalenssi ja konsentraatiot ovat isoimmat. Altistuksen määrää vähentää kuitenkin pieni kulutus. Raakamaidossa pitoisuudet olivat pieniä, mutta altistusta lisää suurempi käyttö etenkin vakiintuneiden kuluttajien keskuudessa. Lihatuotteiden kohdalla altistus arvioitiin hyvin pieneksi. Tällä tavalla arvioituna altistuksen taso on kuitenkin hyvin epätarkka.

Edes suurimmilla mitatuilla *L. monocytogenes* -pitoisuuksilla ei tämän arvion mukaan graavisuolatun tai kylmäsavustetun kalan mukana keskimäärin saada kovin suuria annoksia *L. monocytogenes* -bakteeria (luokkaa 10^5 pmy/50 g annos, P(97,5 %)-arvon mukaan). Sairautta aiheuttava määrää *L. monocytogenes* -bakteerin osalta ei kuitenkaan tiedetä, määrä on ainoastaan pystytty arvioimaan erilaisin perustein. Esimerkiksi Farber *et al* (1996) käyttivät omassa riskinarviointitutkimuksessaan riskiryhmille sairautta aiheuttavana määränä 10^5 – 10^7 pmy ja ei-riskiryhmille 10^7 – 10^9 pmy (10 % ja 90 % populaatiosta sairastuu, asiantuntija-arvio). Nämä luvut ovat samaa suurusluokkaa kuin eläinkokeilla tehdyt havainnot. Riskiryhmille tämä luku saattaa kuitenkin olla liian suuri, sillä pienin annos jonka on todettu sairastuttavan, oli 5–60 pmy/g pienessä ruoka-annoksessa. Näiden lukujen perusteella ei-riskiryhmien edustaja ei välttämättä sairastu edes syödessään kalatuotetta, jossa pitoisuus on suuri. Riskiryhmille kuitenkin sairastuminen on mahdollista.

Listerioositapausten määrä on ollut lievässä kasvussa niin Suomessa kuin Euroopassakin. Suomessa listerioosi on vielä muuhun Eurooppaan verrattuna yleisempi. Vaikka listerioosia tavataan harvoin terveillä lapsilla ja aikuisilla, sillä on silti merkitystä kansanterveyden kannalta, sillä eri riskiryhmiin kuuluvia on Suomessa merkittävä määrä. Esimerkiksi yli 65-vuotiaita on noin miljoona ja määrä on kasvussa. Alle 1 vuoden ikäisiä on yli 58 000 (Anon., 2014e). Huolestuttavaksi listerioosin lisääntymisen tekee se, että listerioosi on monia muita elintarvikevälikkeisiä tauteja

vaarallisempi: siinä on korkeampi kuolleisuus ja sairaalaanjoutumisaste. Listerioosin sporadisen luonteen ja pitkän inkubaatioajan takia sairauden aiheuttaneen elintarvikkeen jäljittäminen on vaikeaa. Näyttäisi siltä, että riskielintarvikkeena pidetyissä tuotteissa, kuten graavisuolatuissa ja kylmäsavustetuissa kalatuotteissa, *L. monocytogenes* -bakteerin esiintyminen on vähentynyt. Laskeva trendi oli myös Patogenixiin ilmoitetuissa *L. monocytogenes* -positiivissa näytteissä. Tämä on ristiriidassa sen kanssa, että listerioositapaukset ovat lisääntyneet. Sairastapausten nousun syyn selvittämiseksi tarvittaisiin lisää tutkimusta sekä uusista elintarvikeryhmistä, joissa *L. monocytogenes* -bakteeria voisi esiintyä, että tarkempaa tietoa etenkin riskiryhmien ruoankäyttötavoista.

Lähteet

Anonyymi, 2015, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013, *Efsa Journal* **13**:3991, 162 s.

Anonyymi, 2014a, Listeria - 18. marraskuuta 2014 - THL, <http://www3.thl.fi/stat/>, luettu 20.11.2014.

Anonyymi, 2014b, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012, *EFSA Journal* **2** 312 s.

Anonyymi, 2014c, Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos: Kalajalosteiden tuotanto (verkkojulkaisu), Suomen virallinen tilasto (SVT), 20.11.2014, saatavilla: http://www.rktl.fi/tilastot/aihealueet/kalajalosteiden_tuotanto/.

Anonyymi, 2014d, CN, <http://uljas.tulli.fi/Dialog/SaveShow.asp>, 9.1.2015.

Anonyymi, 2014e, Väestörekisterikeskus: Asukasluvut, Suomen virallinen tilasto (SVT), 9.2.2015, saatavilla:

http://193.166.171.75/database/StatFin/vrm/vaerak/vaerak_fi.asp.

Anonyymi, 2014f, Maataloustilastot: Elintarvikkeiden kulutus henkeä kohti 1990-2013 (verkkojulkaisu), Suomen virallinen tilasto (SVT), 9.1.2015, saatavilla:

<http://www.maataloustilastot.fi/tilasto/14/tilastojulkaisulistaus>.

Anonyymi, 2014g, Lihavalmisteiden listeriaprojekti (EVO) 2012–2014,

<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/valmistus+ja+myynti/valvonta/tutkimukset+ja+projektit/lihavalmisteiden+listeriaprojekti+-evo-+2012-2013>, 28.11.2014.

Anonyymi, 2014h, About Combase Predictive Models,

<http://modelling.combase.cc/About.aspx>, 13.11.2014

Anonyymi, 2014i, Growth and growth boundary of *L. monocytogenes*,

<http://fssp.food.dtu.dk/Help/Listeria/Lm/lm.htm>, 5.11.2014.

Anonyymi, 2014j, How to input a value for the Phys. state value:,

<http://modelling.combase.cc/HelpPredictor/HowToInputPhys.aspx>, 13.11.2014.

Anonyymi, 2013a, *Listeria monocytogenes*,

<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa+elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia+aiheuttavia+bakteereja/listeria/>, 28.11.2014.

Anonyymi, 2013b, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011, *EFSA Journal* **11** 250 s.

Anonyymi, 2013c, ComBase in a nutshell,

<http://www.combase.cc/index.php/en/about-combase>, 13.11.2014.

Anonyymi, 2013d, Kirjolahifilee, kylmäsavustettu,
<http://www.fineli.fi/food.php?foodid=33409&lang=fi>, 19.12.2014.

Anonyymi, 2013e, Kirjolahifilee, tuoresuolattu,
<http://www.fineli.fi/food.php?foodid=870&lang=fi>, 19.12.2014.

Anonyymi, 2013f, Lohi, tuoresuolattu,
<http://www.fineli.fi/food.php?foodid=818&lang=fi>, 19.12.2014.

Anonyymi, 2013g, Lohifilee, kylmäsavustettu,
<http://www.fineli.fi/food.php?foodid=33420&lang=fi>, 19.12.2014.

Anonyymi, 2013h, Pekoni, filee, rasvaa 18 g,
<http://www.fineli.fi/food.php?foodid=28947&lang=fi>, 19.12.2014.

Anonyymi, 2012, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010, *EFSA Journal* **10** 442 s.

Anonyymi, 2011a, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009, *EFSA Journal* **9** 378 s.

Anonyymi, 2011b, The EFSA Comprehensive European Food Consumption Database,
<http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm>, 11.2.2015.

Anonyymi, 2010, Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008, *EFSA Journal* **8** 368 s.

Anonyymi, 2009a, Risk Characterization of Microbiological Hazards in Food, WHO:n ja FAO:n julkaisu 17 sarjassa Microbiological Risk Assessment Series, saatavilla
<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA17.pdf>.

Anonyymi, 2009b, Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2007, *EFSA Journal* **223** 312 s.

Anonyymi, 2008a, Exposure assessment of microbiological hazards in food, WHO:n ja FAO:n julkaisu 7 sarjassa Microbiological Risk Assessment Series, 115 s. saatavilla http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43389/1/9241546891_eng.pdf?ua=1.

Anonyymi, 2008b, Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2006, *EFSA Journal* **130** 3–352.

Anonyymi, 2007a, The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006, *EFSA Journal* **130** 3–352.

Anonyymi, 2007b, Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness, *The EFSA Journal* **599** 1–42.

Anonyymi, 2006, The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005, *EFSA Journal* **94** 2–288.

Anonyymi, 2005, Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2004, *EFSA Journal* **310** 280 s.

Anonyymi, 2000, Suositus tyhjiöpakattujen kylmäsavustettujen ja graavisuolattujen kalavalmisteiden enimmäissäilytysajaksi, Eviran julkaisu E 11/212/2000.

Anonyymi, 1999, CAC/GL 30-1999: Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment, Codex Alimentarius, 5 s.

Antal, E., Høgåsen, H., Sandvik, L. & Mæhlen, J., 2007, Listeriosis in Norway 1977–2003, *Scan J Infect Dis* **39** 398–404.

Aureli, P., Fiorucci, G., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L. & Salmaso, S., 2000, An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Corn Contaminated by *Listeria monocytogenes*, *N Engl J Med* **342** 1236–1241.

Baranyi, 2001, Modelling microbiological safety, teoksessa *Food Process Modelling*, toim. Tijssens, L., Hertog, M. & Nicolaï, B, Woodhead Publishing, Englanti, ss. 384–386.

Baranyi & Roberts, 1994, A dynamic Approach to Predicting Bacterial Growth in Food, *Int J Food Microb* **23** 277–294.

Beattie, I., Swaminathan, B. & Ziegler, K., 1990, Cloning and Characterization of T-Cell-Reactive Protein Antigens from *Listeria monocytogenes*, *Infect Immun* **58** 2792–2803.

Begot, C., Lebert, I. & lebert, A., 1997, Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions, *Food Microbiol* **14** 403–412.

Borén, T., Falk, P., Roth, K., Larson, G. & Normark, S., 1993, Attachment of *Helicobacter pylori* to Human Gastric Epithelium Mediated by Blood Group Antigens, *Science* **262** 1892–1895.

Brown, M., 2002a, Hazard identification, Teoksessa *Microbiological Risk Assessment in Food Processing*, toim. Brown, M. & Stringer, M., Woodhead Publishing, Englanti.

Brown, M., 2002b, Exposure assessment, Teoksessa *Microbiological Risk Assessment in Food Processing*, toim. Brown, M. & Stringer, M., Woodhead Publishing, Englanti.

Brown, M., 2008, *Chilled Foods - A Comprehensive Guide (3rd Edition)*, 3. painos, Woodhead Publishing, Englanti, ss. 454.

Buchanan, R., Smith, J. & Long, W., 2000, Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization, *Int J Food Microbiol* **58** 159–172.

Carlos de Mattos, L., Rodrigues Cintra, J., Eduardo Sanches, F., de Cássia Martins Alves da Silva, R., Artur Ruiz, M. & Wilson Moreira, H., 2002, ABO, Lewis, secretor and non-secretor phenotypes in patients infected or uninfected by the *Helicobacter pylori* bacillus, *Sao Paulo Med J* **120** 55–58.

Carrique-Mas, J., Hökeberg, I., Andersson, Y., Arneborn, M., Tham, W., Danielsson-Tham, M., Osterman, B., Leffler, M., Steen, M., Eriksson, E., Hedin, G. & Giesecke, J., 2003, Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis?, *Epidemiol Infect* **130** 79–86.

Cortesi, M., Sarli, T., Santoro, A., Murru, N. & Pepe, T., 1997, Distribution and behavior of *Listeria monocytogenes* in three lots of naturally-contaminated vacuum-packed smoked salmon stored at 2 and 10 °C, *Int J Food Microbiol* **37** 209–214.

Czuprynski, C., Brown, J. & Roll, J., 1989, Growth at reduced temperatures increases the virulence of *Listeria monocytogenes* for intravenously but not intragastrically inoculated mice, *Microb Pathogenesis* **7** 213–223.

Dalton, C., Austin, C., Sobel, J., Hayes, P., Bibb, W., Graves, L., Swaminathan, B., Proctor, M. & Griffin, P., 1997, An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to *Listeria monocytogenes* in Milk, *N Engl J Med* **336** 100–106.

Dennis, S., Miliotis, M. & Buchanan, R., 2002, Hazard characterization/dose–response assessment, Teoksessa *Microbiological Risk Assessment in Food Processing*, toim. Brown, M. & Stringer, M., Woodhead Publishing, Englanti.

Drosinos, E. & Paramithiotis, S., 2009, Cured Meats and Poultry, Including Cooked Cured Meats, teoksessa *Microbiology Handbook - Meat Products (2nd Edition)*, toim. Fernandes, R., Royal Society of Chemistry, Englanti, ss. 105.

Farber, J. & Brown, B., 1990, Effect of Prior Heat Shock on Heat Resistance of *Listeria monocytogenes* in Meat, *Appl Environ Microbiol* **56** 1584–1587.

Farber, J., Daley, E., Coates, F., Beausoleil, N. & Fournier, J., 1991, Feeding Trials of *Listeria monocytogenes* with a Nonhuman Primate Model, *J Clin Microbiol* **29** 2606–2608.

Farber, J. & Peterkin, P., 1991, *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen, *Microbiol Rev* **55** 476–511.

Farber, J., Ross, W. & Harwig, J., 1996, Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada, *Int J Food Microbiol* **30** 145–156.

Fleming, D., Cochi, S., MacDonald, K., Brondum, J., Hayes, P., Plikaytis, B., Holmes, M., Audurier, A., Broome, C. & Reingold, A., 1985, Pasteurized Milk as a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis, *N Engl J Med* **312** 404–407.

Foegeding, P., 1997, Driving predictive modelling on a risk assessment path for enhanced food safety, *Int J Food Microbiol* **36** 87–95.

Frye, D., Zweig, R., Sturgeon, J., Torney, M., LeCavalier, M., Lee, I., Lawani, L. & Mascola, L., 2002, An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Delicatessen Meat Contaminated with *Listeria monocytogenes*, *Clin Infect Dis* **35** 943–949.

Gahan, C., O'Driscoll, B. & Hill, C., 1996, Acid Adaptation of *Listeria monocytogenes* Can Enhance Survival in Acidic Foods and during Milk Fermentation, *Appl Environ Microbiol* **62** 3128–3132.

Gaillard, J., Jaubert, F. & Berche, P., 1996, The inlAB Locus Mediates the Entry of *Listeria monocytogenes* into Hepatocytes in Vivo, *J Exp Med* **183** 359–369.

Glass, K. & Doyle, M., 1989, Fate of *Listeria monocytogenes* in Processed Meat Products during Refrigerated Storage, *Appl Environ Microbiol* **55** 1565–1569.

Gerner-Smidt, P., Ethelberg, S., Schiellerup, P., Christensen, J., Engberg, J., Fussing, V., Jensen, A., Jensen, C., Petersen, A. & Bruun, B., 2005, Invasive listeriosis in Denmark 1994–2003: a review of 299 cases with special emphasis on risk factors for mortality, *Clin Microbiol Infect* **11** 618–624.

Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg, A., Niclasen, O. & Bredholt, S., 2004, The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries, *Food Microbiol* **21** 217–225.

Guillier, L., Pardon, P. & Augustin, J., Influence of Stress on Individual Lag Time Distributions of *Listeria monocytogenes*, *Appl Environ Microbiol* **71** 2940–2948.

Gulmez, M. & Guven, A., 2003, Survival of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes 4b and Yersinia enterocolitica O3 in different yogurt and kefir combinations as prefermentation contaminant, *J Appl Microbiol* **95** 631–636.

Guyer, S. & Jemmi, T., 1991, Behavior of Listeria monocytogenes during Fabrication and Storage of Experimentally Contaminated Smoked Salmon, *Appl Environ Microbiol* **57** 1523–1527.

Hansen, L., Gill, T. & Huss, H., 1995, Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon, *Food Res Int* **28** 123–130.

Hatakka, M. & Halonen, H., 2000, Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 1999, Helsinki 2000. Elintarvikeviraston julkaisuja 7/2000, 27 s., saatavilla http://www.zoonosikeskus.fi/portal/fi/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytysepidemiat_suomessa/epidemiat_vuonna_1999/.

Heisick, J., Wagner, D., Nierman, M. & Peeler, J., 1989, Listeria spp. Found on Fresh Market Produce, *Appl Environ Microbiol* **55** 1925–1927.

Hood, J., Finnie, L., Wilson, M., Graham, C., Brett, M. & Hudson, J., 2002, Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats, *Lett Appl Microbiol* **35** 409–413.

Hulkko, T., Lyytikäinen, O., Jaakola, S., Kuusi, M., Puumala, J. & Ruutu, P., 2011, Tartuntataudit Suomessa 2010, THL:n Raportti / Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos (THL) : 17/2011, saatavilla <http://urn.fi/URN:NBN:fi-fe201205085422>.

Hulkko, T., Lyytikäinen, O., Kuusi, M., Seppälä, S., & Ruutu, P., 2010, Tartuntataudit Suomessa 1995-2009, THL:n Raportti / Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos (THL) : 17/2010, saatavilla <http://urn.fi/URN:NBN:fi-fe201205085420>.

Huss, H., Reilly, A. & Embarek, K., 2000, Prevention and control of hazards in seafood, *Food Control* **11** 149–156.

Jaakola, S., Lyytikäinen, O., Rimhanen-Finne, R., Salmenlinna, S., Savolainen-Kopra, C., Pirhonen, J., Vuopio, J., Jalava, J., Toropainen, M., Nohynek, H., Toikkanen, S., Löflund, J., Kuusi, M. & Salminen, M., 2014, Tartuntataudit Suomessa 2014, THL:n Raportti: 16/2014, saatavilla <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-302-190-7>.

Jaakola, S., Lyytikäinen, O., Rimhanen-Finne, R., Salmenlinna, S., Vuopio, J., Roivainen, M., Nohynek, H., Löflund, J., Kuusi, M. & Ruutu, P., 2013, Tartuntataudit Suomessa 2012, THL:n Raportti: 10/2013, saatavilla <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-245-890-2>.

Jaakola, S., Lyytikäinen, O., Rimhanen-Finne, R., Salmenlinna, S., Vuopio, J., Roivainen, M., Löflund, J., Kuusi, M. & Ruutu, P., 2012, Tartuntataudit Suomessa 2011, THL:n Raportti: 36/2012, saatavilla <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-245-658-8>.

Johansson, T. & Nuppunen, M., 2006, *Listeria monocytogenes* -bakteerin esiintyminen graavi- ja kylmäsavukaloissa ja mädissä, EVI-EELA -julkaisuja 1/2006 Mikrobiologisten tutkimusprojektien tuloksia 2003 ja 2004, 43 s.

Jouve, J., 2002, Microbiological risk assessment (MRA): an introduction, Teoksessa *Microbiological Risk Assessment in Food Processing*, toim. Brown, M. & Stringer, M., Woodhead Publishing, Englanti.

Kalmus, P., Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K. & Viltrop, A., 2015, Quality of raw milk intended for direct consumption in Estonia, *Food Control* **51** 135–139.

Knabel, S., Walker, H., Hartman, P. & Mendonca, A., 1990, Effects of Growth Temperature and Strictly Anaerobic Recovery on the Survival of *Listeria monocytogenes* during Pasteurization., *Appl Environ Microbiol* **56** 370–376.

Lammerding, A. & Fazil, A., 2000, Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment, *Int J Food Microbiol* **58** 147–157.

Leggett, L., Tomasula, P., Van hekken, D., Porto-Fett, A., Shoyer, B., Renye, J., Luchansky, J. & Farkye, N., 2012, Effect of Storage at 4 and 10C on the Growth of *Listeria monocytogenes* in and on Queso Fresco, *J Food Safety* **32** 236–245.

Leimeister-Wächter, M., Domann, E. & Chakraborty, T., 1991, The Expression of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes* Is Thermoregulated, *J Bacteriol* **174** 947–952.

Lunden, J., Miettinen, M., Autio, T. & Korkeala, H., 2000, Persistent *Listeria monocytogenes* Strains Show Enhanced Adherence to Food Contact Surface after Short Contact Times, *J Food Protect* **63** 1204–1207.

Lyytikäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttila, V., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala, H. & Siltonen, A., 2000, An Outbreak of *Listeria Monocytogenes* Serotype 3a Infections from Butter in Finland, *J Infect Dis* **181** 1838–1841.

Machesky, 1997, Cell motility: Complex dynamics at the leading edge, *Curr Biol* **7** 164–167.

McLauchlin, J., 2006, Listeria, teoksessa *Emerging Foodborne Pathogens*, toim. Motarjemi, J. & Adams, M., Woodhead Publishing, Englanti, ss. 406–428.

McLauchlin, J., Mitchell, R., Smerdon, W. & Jewell, K., 2004, *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods, *Int J Food Microbiol* **92** 15– 33.

Mead, P., Dunne, E., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S., Salehi, E., Mostashari, F., Craig, A., Mshar, P., Bannerman, T., Sauders, B., Hayes, P., Dewitt, W., Sparling, P., Griffin, P., Morse, D., Slutsker, L. & Swaminathan, B., 2006, Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat, *Epidemiol Infect Aug* **134** 744–751.

Mead, P., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L., Griffin, P. & Tauxe, R., 1999, Food-Related Illness and Death in the United States, *Emerg Infect Dis* **5** 607–625.

Mejholm, O. & Dalgaard, P., 2015, Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and psychrotolerant lactic acid bacteria in processed seafood and mayonnaise-based seafood salads, *Food Microbiol* **46** 1–14.

Mekalanos, J., 1992, Environmental Signals Controlling Expression of Virulence Determinants in Bacteria, *J Bacteriol* **174** 1–7.

Membré, J.-M., Ross, T. & McMeeking, T., 1999, Behaviour of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes, *Lett Appl Microbiol* **28** 216–220.

Miettinen, M., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Björkroth, K. & Korkeala, H., 1999, Molecular Epidemiology of an Outbreak of Febrile Gastroenteritis Caused by *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Rainbow Trout, *J Clin Microbiol* **37** 2358–2360.

Nauta, M., 2000, Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models, *Int J Food Microbiol* **57** 9–18.

Nesbakken, T., Kapperud, G. & Caugant, D., 1996, Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry, *Int J Food Microbiol* **31** 161–171.

Niskanen, T., Johansson, T., Siitonen, A. & Kuusi, M., 2007, Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2006, Elintarviketurvallisuusviraston julkaisuja 21/2007, 62 s., saatavilla
<http://www.evira.fi/portal/fi/tietoa+evirasta/julkaisut/?a=view&productId=182>.

O'Driscoll, B., Gahan, C. & Hill, C., 1996, Adaptive Acid Tolerance Response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an Acid-Tolerant Mutant Which Demonstrates Increased Virulence, *Appl Environ Microbiol* **62** 1693–1689.

Olsen, N. & Motarjemi, Y., 2014, Food Safety and Ethics, teoksessa *Encyclopedia of Food Safety* toim. Motarjemi, Y., Moy, G. & Todd, E., Elsevier, USA, ss. 341.

Palumbo, S. & Williams, A., 1991, Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods, *Food Microbiol* **8** 63–68.

Pawsey, R., 2002, *Case Studies in Food Microbiology for Food Safety and Quality*, Royal Society of Chemistry, Englanti, ss. 270–284.

Perkiömäki, J., Leimi, A. & Tuominen, P., 2012, Suomessa tuotetun raakamaidon biologiset vaarat, Eviran tutkimuksia 4/2012, saatavilla
<http://www.evira.fi/portal/fi/tietoa+evirasta/julkaisut/?a=view&productId=317>.

Phan, V., van Boekel, M., Dekker, M. & Garczarek, U, 2010, Bayesian networks for food science: theoretical background and potential applications, teoksessa *Consumer-Driven Innovation in Food and Personal Care Products*, toim. Jaeger, S. & McFie, H., Woodhead Publishing, Iso-Britannia, ss. 488–513.

Phillips, C., 1996, Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce, *Int J Food Microbiol* **31** 463–479.

Pine, L., Malcom, G. & Plikaytis, B., 1990, *Listeria monocytogenes* Intragastric and Intraperitoneal Approximate 50% Lethal Doses for Mice Are Comparable, but Death Occurs Earlier by Intragastric Feeding, *Infect Immun* **58** 2940–2945.

Raulo, S., Pelkonen, S., Kaartinen, L., Myllyniemi, A., Oksanen, A., Tuominen, P., Korpela, P., Oivanen, L., Marmo, S., Kiviruusu, S., Siitonen, A. & Kuusi, M., 2012, Zoonoosit Suomessa 2000–2010, Zoonoosikeskuksen raportti, 88 s., saatavilla http://www.zoonoosikeskus.fi/attachments/zoonoosit/zoonoosit_suomessa_paivitys_joulu2012_final_nettiversio.pdf.

Roberts, A. & Widmann, M., 2003, Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis, *Cell Mol Life Sci* **60** 904–918.

Robinson, T., Ocio, M., Kaloti, A. & Mackey, B., 1998, The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*, *Int J Food Microbiol* **44** 83–92.

Ross, T. & Sumner, J., 2002, A simple, spreadsheet-based, food safety risk assessment tool, *Int J Food Microbiol* **77** 39–53.

Ruusunen, M., Salonen, M., Pulkkinen, H., Huuskonen, M., Hellström, S., Revez, J., Hänninen, M., Fredrikson-Ahomaa, M & Lindström, M., 2013, Pathogenic Bacteria in Finnish Bulk Tank Milk, *Foodborne Pathog Dis* **10** 99–106.

Ryser, E. & Buchanan, R., 2013, *Listeria monocytogenes*, teoksessa *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers (4th Edition)*, 4. painos, toim. Doyle, M. & Buchanan, R., American Society for Microbiology (ASM), USA, ss. 503–525.

Schuchat, A., Swaminathan, B. & Broome, C., 1991, Epidemiology of human listeriosis, *Clin Microbiol Rev* **4** 169–183.

Schvartzman, M., Belessi, X., Butler, F., Skandamis, P. & Jordan, K., 2010, Comparison of growth limits of *Listeria monocytogenes* in milk, broth and cheese, *J Appl Microbiol* **109** 1790–1799.

Scotter, S., Langton, S., Lombard, B., Schulden, S., Nagelkerke, N., In't Veld, P., Rollier, P. & Lahellec, C., 2001, Validation of ISO method 11290 Part 1 — Detection of *Listeria monocytogenes* in foods, *Int J Food Microbiol* **64** 295–306.

Silvennoinen, K., Koivupuro, H., Katajajuuri, J., Jalkanen, L. & Reinikainen, A., 2012, Ruokahävikki suomalaisessa ruokaketjussa, MTT Raportti 41, saatavilla <http://www.mtt.fi/mttraportti/pdf/mttraportti41.pdf>, 10.2.2015.

Sim, J., Hood, D., Finnie, L., Wilson, M., Graham, C., Brett, M. & Hudson, J., 2002, An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to *Listeria monocytogenes* in Milk, *Lett Appl Microbiol* **35** 409–413.

Smith, G., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N., Portnoy, D., Goldfine, H., 1995, The Two Distinct Phospholipases C of *Listeria monocytogenes* Have Overlapping Roles in Escape from a Vacuole and Cell-to-Cell Spread, *Infect Immun* **63** 4231–4237.

Spiegelhalter, D., Best, N., Carlin, B. & van der Linde, A., 2002, Bayesian measures of model complexity and fit, *J R Statist Soc* **64** 583–639.

Sprong, R., Hullstein, M. & Van der Meer, R., 1999, High Intake of Milk Fat Inhibits Intestinal Colonization of *Listeria* but Not of *Salmonella* in Rats, *J Nutr* **129** 1382–1389.

Sugiyama, H., 1951, Studies on Factors Affecting the Heat Resistance of Spores of *Clostridium botulinum*, *J Bacteriol* **62** 81–96.

Thurette, J., Membré, J., Ching, L., Tailliez, R. & Catteau, M., 1998, Behavior of *Listeria* spp. in smoked fish products affected by liquid smoke, NaCl concentration, and temperature, *J Food Protect* **61** 1475–1479.

Teunis, P., Nagelkerke, N. & Haas, C., 1999, Dose Response Models For Infectious Gastroenteritis, *Risk Anal* **19** 1251–1260.

Tilney, L. & Portnoy, D., 1989, Actin Filaments and the Growth, Movement, and Spread of the Intracellular Bacterial Parasite, *Listeria monocytogenes*, *J Cell Biol* **109** 1597–1608.

Todd, E., 2014, Personal Hygiene and Health, Teoksessa Food Safety Management - A Practical Guide for the Food Industry, toim. Motarjemi, Y. & Huub, L., Elsevier, USA, ss. 774.

Voysey, P., Jewell, K. & Stringer, M., 2002, Risk characterization, Teoksessa *Microbiological Risk Assessment in Food Processing*, toim. Brown, M. & Stringer, M., Woodhead Publishing, Englanti.

Walsh, D., Sheridan, J., Duffy, G., Blair, I. & McDovell, D., 2001, Thermal resistance of wild-type and antibiotic-resistant *Listeria monocytogenes* in meat and potato substrates, *J Appl Microbiol* **90** 555–560.

Wareing, P., Stuart, F. & Fernandes, R., 2010, *Micro-Facts - The Working Companion for Food Microbiologists (7th Edition)*, 7. painos, Royal Society of Chemistry, Englanti, ss. 89–103.

Weis, J. & Seeliger, H., 1975, Incidence of *Listeria monocytogenes* in Nature, *Appl Microbiol* **30** 29–32.

Whitley, E., Muir, D. & Waites, W., 2000, The growth of *Listeria monocytogenes* in cheese packed under a modified atmosphere, *J Appl Microbiol* **88** 52–57.